

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Kristýna Závíšková

Vliv chronické hypoxie na antioxidační kapacitu myokardu potkana

Effect of chronic hypoxia on antioxidative capacity of rat myocardium

Diplomová práce

Školitelka: Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Konzultantka: Mgr. Petra Míčová

Praha, 2014

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2014

Podpis:.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. a konzultantce Mgr. Petře Míčové za čas, který mi věnovaly, a za cenné rady ohledně experimentální práce i psaní této diplomové práce. Děkuji také prof. RNDr. Františkovi Kolářovi, CSc. za poskytnutí experimentálního modelu. Dále děkuji kolektivu naší laboratoře, především RNDr. Kristýně Holzerové za pomoc a příjemné pracovní prostředí. Děkuji také RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D. a RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. za pomoc při experimentech. V neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat svým rodičům a příteli za všestrannou podporu a pochopení.

ABSTRAKT

Adaptace na chronickou hypoxii aktivuje endogenní signální dráhy vedoucí ke zvýšené odolnosti srdce k akutnímu ischemicko/reperfúznímu (I/R) poškození. Molekulární mechanismus tohoto jevu není zatím zcela objasněn. Bylo však prokázáno, že se v signální dráze kardioprotekce indukované chronickou hypoxií uplatňují reaktivní formy kyslíku (ROS), jejichž zvýšená hladina musí být přísně regulována antioxidačním systémem buňky. Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv intermitentní hypobarické hypoxie (IHH, 7 000 m) na relativní zastoupení antioxidačních enzymů (peroxiredoxin 6 – PRX6, thioredoxin 1 a 2 – TRX1 a TRX2, thioredoxinreduktáza 1 – TRXR1) a rovněž enzymů metabolismu železa (hemoxygenáza 1 a 2 – HO1 a HO2, akonitáza 1 a 2 – ACO1 a ACO2), které se podílí na regulaci redoxního stavu buňky. Současně jsme stanovili vliv adaptace na IHH a antioxidantu tempolu na relativní množství na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ (iPLA₂). iPLA₂ se jednak podílí na odstraňování peroxidovaných mastných kyselin z membránových fosfolipidů, na druhou stranu za I/R podmínek buňku spíše poškozuje. Všechny enzymy byly stanoveny metodou Western blot v homogenátu z normoxického a na IHH adaptovaného myokardu levé komory potkana. Zjistili jsme, že se po adaptaci na IHH snižuje relativní množství PRX6 a naopak se zvyšuje množství TRX1 a HO1. Změny TRX1 po adaptaci na IHH jsme dále studovali metodou nepřímé imunofluorescence a zjistili jsme, že se TRX1 za těchto podmínek translokuje z cytosolu do jádra. Na relativní množství ostatních antioxidačních enzymů a enzymů metabolismu železa (TRX2, TRXR1, HO2, ACO1 a ACO2) neměla adaptace na IHH vliv. Pozorovali jsme také pokles v relativním zastoupení iPLA₂ po adaptaci na IHH, který je pravděpodobně způsoben zvýšeným oxidačním stresem, protože antioxidant tempol tento efekt zvrátil. Výsledky této diplomové práce tedy naznačují úlohu TRX1 a HO1 v protektivních endogenních signálních drahách aktivovaných adaptací na IHH.

Klíčová slova: myokard, chronická hypoxie, ischemie, oxidační stres, antioxidační enzymy, metabolismus železa, na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂

SUMMARY

Adaptation to chronic hypoxia activates endogenous signaling cascades, which lead to cardiac protection against acute ischemia/reperfusion (I/R) injury. The molecular mechanism of this phenomenon has not been fully clarified yet. However, it was proved that reactive oxygen species (ROS) take part in cardioprotective signaling pathway induced by chronic hypoxia. The high level of ROS must be precisely regulated by antioxidative system of a cell. The aim of diploma thesis was to examine the effect of intermittent hypobaric hypoxia (IHH, 7 000 m) on relative amount of antioxidative enzymes (peroxiredoxin 6 – PRX6, thioredoxin 1 and 2 – TRX1 and TRX2, thioredoxin reductase 1 – TRXR1) and also enzymes of iron metabolism (heme oxygenase 1 and 2 – HO1 and HO2, aconitase 1 and 2 – ACO1 and ACO2), which participate in regulation of cell redox state. Moreover, we studied the effect of adaptation to IHH and an antioxidant tempol on relative amount of calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂). iPLA₂ can remove peroxidized fatty acids from membrane phospholipids. On the other hand, iPLA₂ can damage cell in I/R conditions. All enzymes were studied in homogenates from normoxic and IHH adapted rat left ventricular myocardium by Western blot. Adaptation to IHH caused a decrease of PRX6 and on the opposite an increase of TRX1 and HO1 content. We also studied changes in TRX1 after adaptation to IHH by indirect immunofluorescence method and we showed a translocation of TRX1 from cytosol to nucleus. Adaptation to IHH had no effect on other antioxidative enzymes and enzymes of iron metabolism (TRX2, TRXR1, HO2, ACO1 and ACO2). Furthermore, we observed a decrease in relative amount of iPLA₂ after adaptation to IHH. It is probably caused by oxidative stress because the antioxidant tempol reversed this effect. In conclusion, results of this diploma thesis show the importance of TRX1 and HO1 in protective endogenous signaling cascades activated by adaptation to IHH.

Key words: myocardium, chronic hypoxia, ischemia, oxidative stress, antioxidative enzymes, iron metabolism, calcium-independent phospholipase A₂

OBSAH

Seznam zkratk	1
1 Úvod.....	4
2 Literární přehled	6
2.1 Protekce ischemického myokardu	6
2.2 Chronická hypoxie	6
2.2.1 Účinky adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii	8
2.2.2 Signální dráhy aktivované adaptací na intermitentní hypobarickou hypoxii	9
2.3 Reaktivní formy kyslíku.....	11
2.3.1 Tempol	12
2.4 Antioxidační systém buňky.....	13
2.5 Thioredoxinový systém.....	15
2.5.1 Peroxiredoxiny.....	15
2.5.2 Thioredoxiny.....	17
2.5.3 Thioredoxinreduktázy	18
2.6 Enzymy metabolismu železa.....	19
2.6.1 Hemoxygenázy	21
2.6.2 Akonitázy.....	23
2.7 Fosfolipázy A ₂	23
2.7.1 Na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂	24
3 Cíle diplomové práce	27
4 Materiál a metody	28
4.1 Laboratorní zvířata	28
4.2 Experimentální model intermitentní hypobarické hypoxie.....	28
4.2.1 Efekt intermitentní hypobarické hypoxie	28
4.2.2 Vliv tempolu	28
4.2.3 Odběr tkáně k analýzám	29
4.3 Zdroje používaných chemikálií.....	30
4.4 Stanovení relativního množství proteinů	31
4.4.1 Homogenizace srdeční tkáně	31
4.4.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	31
4.4.3 SDS-PAGE	32

4.4.4 Western blot.....	34
4.4.5 Imunodetekce.....	35
4.4.6 Metoda zesílené chemiluminiscence	36
4.4.7 Vyhodnocení relativního množství proteinů a zpracování dat	37
4.5 Nepřímá imunofluorescence	38
4.5.1 Vyhodnocení nepřímé imunofluorescence a zpracování dat	39
5 Výsledky	40
5.1 Hmotnostní parametry.....	40
5.2 Koncentrace proteinů v homogenátu	41
5.3 Testování hypoxantinguaninfosforibosyltransferázy 1 jako housekeeping proteinu pro model intermitentní hypobarické hypoxie.....	41
5.4 Relativní množství antioxidantních enzymů po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii	43
5.4.1 Identifikace antioxidantních enzymů	43
5.4.2 Relativní zastoupení antioxidantních enzymů	45
5.5 Imunofluorescenční lokalizace thioredoxinu 1 po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii	49
5.6 Relativní množství enzymů metabolismu železa po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii	50
5.6.1 Identifikace enzymů metabolismu železa	50
5.6.2 Relativní zastoupení enzymů metabolismu železa	52
5.7 Vliv tempolu na relativní zastoupení na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii.....	56
6 Diskuze	57
6.1 Hmotnostní parametry.....	57
6.2 Hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1 jako housekeeping protein.....	57
6.3 Antioxidantní enzymy v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii	58
6.3.1 Imunodetekce antioxidantních enzymů	58
6.3.2 Relativní množství antioxidantních enzymů.....	59
6.4 Enzymy metabolismu železa v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii	63
6.4.1 Imunodetekce enzymů metabolismu železa	63
6.4.2 Relativní množství enzymů metabolismu železa.....	63

6.5 Relativní množství na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂ v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii – vliv tempolu.....	66
7 Shrnutí.....	69
8 Závěr	70
9 Seznam použité literatury	71

Seznam zkratek

ACO	Akonitáza (z angl. <i>aconitase</i>)
AP-1	Transkripční faktor (z angl. <i>activator protein 1</i>)
ARE	Element citlivý na antioxidanty (z angl. <i>antioxidant response element</i>)
ASK1	Kináza regulující apoptózu (z angl. <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>)
Asp	Kyselina asparagová
ATP	Adenosin-5-trifosfát
BEL	Bromenollakton (inhibitor na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂)
BPB	Bromfenolová modř (z angl. <i>bromophenol blue</i>)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BW	Hmotnost těla (z angl. <i>body weight</i>)
CAT	Kataláza (z angl. <i>catalase</i>)
c-Myc	Transkripční faktor (z angl. <i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)
CO	Oxid uhelnatý
C _P	Peroxidovaný cystein peroxiredoxinů
C _R	Cystein peroxiredoxinů, který tvoří disulfidický můstek (z angl. <i>resolving cystein</i>)
Cu/ZnSOD	Měď/zinková superoxiddizmutáza
Cys	Cystein
DAPI	Fluorescenční barvivo (4',6-diamidino-2-fenyindol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiotreitol
ECL	Metoda zesílené chemiluminiscence (z angl. <i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Kyselina ethylenglykoltetraoctová
FA	Mastná kyselina (z angl. <i>fatty acid</i>)
FA-CoA	Acyl-koenzym A řetězec mastné kyseliny (z angl. <i>fatty acid-coenzyme A</i>)
FAD	Flavinadenindinukleotid (z angl. <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
Fe	Železo
Fe-S	Železo-sirný
GMP	Guanosin-5-monofosfát
GPX	Glutathionperoxidázy
GSH	Redukovaná forma glutathionu
GSSG	Oxidovaná forma glutathionu
H ₂ O	Voda
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HEPES	Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetansulfonová
HIF	Hypoxií indukovaný faktor
His	Histidin

HO	Hemoxygenázy
HOC1	Kyselina chlorná
HPRT1	Hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1
HRP	Křenová peroxidáza (z angl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSP	Stresový protein (z angl. <i>heat shock protein</i>)
HW	Hmotnost srdce (z angl. <i>heart weight</i>)
I/R	Ischemicko/reperfúzní
IHH	Intermitentní hypobarická hypoxie
iPLA ₂	Na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂ (z angl. <i>calcium independent phospholipases A₂</i>)
IRE	Element citlivý na železo (z angl. <i>iron responsive element</i>)
IRP	Proteiny regulující železo (z angl. <i>iron regulatory proteins</i>)
LV	Levá komora (z angl. <i>left ventricle</i>)
LVW	Hmotnost levé komory (z angl. <i>left ventricle weight</i>)
MAPK	Kináza aktivovaná mitogenem (z angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mK _{ATP}	Mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP
MnSOD	Manganová superoxiddizmutáza
MPTP	Mitochondriální pór (z angl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NAC	N-acetylcystein
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (z angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF-κB	Transkripční faktor (z angl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NO	Oxid dusnatý
Nrf2	Transkripční faktor (z angl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
O ₂	Kyslík
O ₂ [•]	Superoxidový radikál
OH [•]	Hydroxylový radikál
P _B	Barometrický tlak
PBS	Fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PKC	Proteinkináza C
PLA ₂	Fosfolipázy A ₂ (z angl. <i>phospholipases A₂</i>)
PLC	Fosfolipázy C (z angl. <i>phospholipases C</i>)
PO ₂	Parciální tlak kyslíku
PRX	Peroxiredoxiny
RGB	Barevný formát (z angl. <i>red-green-blue</i>)
RNS	Reaktivní formy dusíku (z angl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROOH	Hydroperoxidy
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. <i>real time-polymerase chain reaction</i>)
RVW	Hmotnost pravé komory (z angl. <i>right ventricle weight</i>)
S. E. M.	Střední chyba průměru (z angl. <i>standard error of the mean</i>)

SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Sec	Selenocystein
Ser	Serin
SH	Thiolová skupina
SO ₂ H	Kyselina sulfinová
SO ₃ H	Kyselina sulfonová
SOD	Superoxiddizmutázy
SOH	Kyselina sulfenová
SW	Hmotnost septa (z angl. <i>septum weight</i>)
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
TIFF	Formát pro soubory bitmapových obrázků (z angl. <i>tagged image file format</i>)
TK	Tyrozinkináza
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRX	Thioredoxiny
TRXR	Thioredoxinreduktázy
TTBS	Solný roztok pufovaný Tris s Tweenem 20 (z angl. <i>tween tris buffered saline</i>)
π-GST	Glutathion S-transferáza

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění představují závažný zdravotní problém ve vyspělých zemích světa včetně České republiky. Proto se řada výzkumných laboratoří zaměřuje na objasnění příčin, mechanismů, léčbu a prevenci těchto onemocnění. V dnešní době jsou známy dva hlavní způsoby aktivace endogenní kardioprotekce. Jde o ischemický preconditioning a adaptaci myokardu na chronickou hypoxii. Preconditioning jsou opakované krátkodobé epizody ischemie. Jeho nevýhodou je ale poměrně krátké trvání protektivních účinků působících na srdce. V tomto ohledu je výhodnější adaptace na chronickou hypoxii, kde protektivní efekt přetrvává mnohem déle.

Už v padesátých letech 20. století bylo pozorováno, že vystavení organismu chronické hypoxii vyvolané vysokou nadmořskou výškou snižuje riziko infarktu myokardu. Později bylo prokázáno, že pro protekci srdce není nutný dlouhodobý pobyt ve vysokohorském prostředí, ale postačí krátkodobé, přerušované vystavení organismu nižšímu tlaku vzduchu, který odpovídá určité nadmořské výšce. Na základě tohoto pozorování byl vytvořen model intermitentní hypobarické hypoxie (IHH), při kterém jsou organismy po několik hodin denně chovány v hypobarické komoře, která barometrickým tlakem vzduchu a parciálním tlakem kyslíku imituje vysokohorské podmínky. Adaptace na IHH má prokazatelné kardioprotektivní účinky, které přetrvávají týdny až měsíce po ukončení adaptace. Jedná se především o zmenšení velikosti tkáně zasažené infarktem, zlepšení postischemického obnovení srdeční funkce a snížení množství a závažnosti srdečních arytmií.

Molekulární mechanismus adaptace na IHH nebyl dosud objasněn. V procesu adaptace na IHH hraje roli celá řada signálních komponent. V naší laboratoři bylo prokázáno, že jsou do signální dráhy zapojeny mj. reaktivní formy kyslíku (ROS). Jejich zvýšená produkce při střídání hypoxických a normoxických epizod v procesu adaptace na IHH je provázena nárůstem množství srdeční manganové superoxiddizmutázy (MnSOD), která je primárním antioxidačním enzymem. Proto jsme se dále zaměřili na studium efektu IHH na jiné antioxidační enzymy. S tím souvisí i výzkum účinků IHH na enzymy metabolismu železa, neboť volné železo a hem se díky svému prooxidačnímu působení také účastní regulace redoxního stavu buňky. Dále jsme uvažovali, že by se v mechanismu protekce vyvolané adaptací na IHH mohly rovněž uplatňovat na kalcium nezávislé fosfolipázy A_2 (iPLA₂), které hydrolyzují membránové fosfolipidy. Tyto enzymy mohou působit dvěma způsoby. Jednak je jejich účinek protektivní, protože se podílejí na

remodelaci buněčných membrán zejména za stresových stavů (např. oxidační stres), a jednak poškozující, neboť za různých patologických stavů (např. ischemie) mohou buněčné membrány degradovat za současné produkce signálních molekul zahrnutých v zánětlivých procesech.

V diplomové práci jsme si proto stanovili za cíl zjistit relativní množství vybraných antioxidačních enzymů (peroxiredoxin 6, thioredoxin 1 a 2, thioredoxinreduktáza 1) a enzymů metabolismu železa (hemoxygenáza 1 a 2, akonitáza 1 a 2) v myokardu potkanů adaptovaných na IHH v porovnání s kontrolními normoxickými zvířaty. Dále jsme sledovali relativní zastoupení iPLA₂ po adaptaci na IHH a po chronickém podávání antioxidantu tempolu. Stanovení efektu IHH na tyto enzymy by mohlo přispět k pochopení protektivních signálních drah a odhalení dalších signálních molekul aktivovaných touto adaptací, které mohou přispět k rozšíření farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění.

Diplomová práce byla vypracována na Katedře buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v úzké spolupráci s Oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze. Práce byla finančně zajištěna grantem GAČR P303/12/1162.

2 Literární přehled

2.1 Protekce ischemického myokardu

Kardiovaskulární onemocnění, zejména ischemická choroba srdeční, jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Proto se řada výzkumů zaměřuje na ochranu srdce před ischemicko/reperfúzním (I/R) poškozením. Bylo prokázáno, že vystavení organismu hypoxii nebo krátké, opakované ischemii zvyšuje endogenní odolnost srdce vůči akutnímu I/R poškození. Pojmy hypoxie a ischemie jsou často zaměňovány. Hypoxie představuje nerovnováhu mezi dodávkou kyslíku a jeho spotřebou ve tkáni, zatímco ischemie znamená částečné nebo úplné přerušení krevního zásobení dané tkáně. V obou případech tedy dochází ke snížení dodávky kyslíku do tkáně. Co se týče myokardu, je při ischemii postižena pouze část tkáně, ve které bylo přerušeno krevní zásobení, kdežto hypoxie působí na celý myokard. Na druhou stranu je při hypoxii zachován koronární průtok, takže dochází k zásobení tkáně substráty a odplavování metabolických produktů (Moret, 1980).

V současné době jsou nejefektivnějšími způsoby aktivace endogenních protektivních mechanismů myokardu vůči I/R poškození krátkodobá adaptace na sérii krátkých ischemických epizod oddělených periodami reperfúze, tzv. ischemický preconditioning, a dlouhodobá adaptace myokardu na chronickou hypoxii. Protektivní efekt vyvolaný ischemickým preconditioningem přetrvává hodiny až dny (Yellon & Downey, 2003). Oproti tomu efekt chronické hypoxie přetrvává týdny až měsíce, což je výhodnější z hlediska uplatnění v klinické praxi (Xu et al., 2011).

2.2 Chronická hypoxie

Hypoxii lze dělit z několika hledisek. Podle délky trvání se dělí na akutní (hypoxický podnět působí minuty až dny) nebo chronickou (hypoxický podnět působí týdny až roky). Dále může být hypoxie dělena podle selhání některého článku transportu kyslíku k buňkám. Sem patří ischemická hypoxie, která nastává při nedostatečném průtoku krve kapilárami (např. při selhání srdce). Kromě toho sem lze zařadit hypoxemickou hypoxii, při které je snížen parciální tlak kyslíku (PO_2) v arteriální krvi, aniž by byl ovlivněn průtok krve (např. ve vysokých horách). Dalším typem je anemická hypoxie, při níž je zachován normální PO_2 , ale je snížena transportní kapacita krve pro kyslík, což může být způsobeno sníženým počtem červených krvinek nebo špatnou funkcí hemoglobinu (Ošťádal & Kolář, 2007).

Hypoxie může být také dělena podle toho, jakým způsobem dochází ke snížení obsahu kyslíku ve vzduchu. U normobarické hypoxie je zachován barometrický tlak (P_B) okolního vzduchu, ale mění se procentuální zastoupení jednotlivých plynů. Při hypobarické hypoxii je snížen P_B vzduchu, a tedy i PO_2 . Hypobarická hypoxie simuluje vysokohorské podmínky, protože nastavená hladina P_B a PO_2 odpovídá určité nadmořské výšce (např. $P_B = 41$ kPa; $PO_2 = 8,6$ kPa odpovídá 7 000 m n. m.). Hypoxie se dá také rozdělit na kontinuální, která probíhá nepřetržitě, a intermitentní, při které se střídají normoxické a hypoxické epizody.

Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie byly objeveny v padesátých letech 20. století. Tehdy bylo pozorováno, že lidé žijící ve vysokých nadmořských výškách (konkrétně v Peru – 4 000 m n. m.) vykazují nižší výskyt infarktu myokardu ve srovnání s lidmi žijícími v nižších nadmořských výškách. Toto pozorování bylo potvrzeno epidemiologickým výzkumem v Novém Mexiku v sedmdesátých letech 20. století. Z experimentálních důvodů byla proto vytvořena hypobarická komora, která imituje prostředí vysokých hor v laboratorních podmínkách (Ošťádal & Kolář, 2007).

První experiment v hypobarické komoře provedli v roce 1958 v Praze fyziologové Kopecký a Daum. Potkani byli šest týdnů adaptováni na nadmořskou výšku 7 000 m. Výsledkem bylo zlepšení obnovy kontraktilní funkce srdce během reoxygenace v porovnání s kontrolními zvířaty (Kopecký & Daum, 1958). Další pokusy s modelem chronické hypoxie odhalily zmenšení oblasti zasažené infarktem myokardu (Meerson et al., 1973; Turek et al., 1980), lepší obnovu srdeční funkce (McGrath et al., 1973; Tajima et al., 1994; Widimský et al., 1973), nižší výskyt a závažnost srdečních arytmií (Meerson et al., 1989; Meerson et al., 1987) a sníženou srdeční fibrózu (Xu et al., 2011).

V řadě studií bylo zjištěno, že na myokard působí účinně nejen kontinuální hypoxická adaptace, ale také intermitentní hypoxie. Pro adaptaci myokardu stačí přerušované působení hypoxického podnětu několik hodin denně po několik dní (např. 4 hodiny denně, 24 expozic) (McGrath et al., 1973; Widimský et al., 1973). Nicméně hranice, od které dochází k fyziologickým a patologickým změnám myokardu při hypoxické expozici, není přesně stanovena. Některé laboratoře považují výšku 3 000 m n. m. za minimální hranici pro rozvoj hypoxických funkčních a strukturálních změn. Jiná experimentální pracoviště považují za tuto pomyslnou hranici nižší nadmořskou výšku (Kolář et al., 1988). Navíc existuje mnoho protokolů lišících se typem hypoxie, množstvím kyslíku, délkou cyklu, počtem cyklů za den a celkovým počtem expozic.

Metodika společně s druhem, věkem a pohlavím experimentálního zvířete výrazně ovlivňuje výsledek experimentu (Yin et al., 2012).

2.2.1 Účinky adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

Při vystavení myokardu intermitentní hypobarické hypoxii (IHH) dochází především ke snížení velikosti infarktu myokardu (Neckář et al., 2002), zlepšení postischemické obnovy kontraktilní funkce (Tajima et al., 1994) a nižšímu výskytu a závažnosti ischemických a reperfúzních arytmií (Asemu et al., 2000). Dalším pozitivním účinkem adaptace na IHH je pokles apoptózy kardiomyocytů, díky snížení exprese proapoptotického proteinu Bax a zvýšení exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Dong et al., 2003). Mění se i metabolismus kardiomyocytů, přičemž aerobní metabolismus, včetně oxidace mastných kyselin, je potlačen, zatímco metabolismus glukózy je zvýšen, což snižuje spotřebu kyslíku v myokardu (Moret, 1980). Současně je snížena i spotřeba ATP prostřednictvím utlumení procesů závislých na ATP, jako je syntéza proteinů a transport iontů (Hochachka & Lutz, 2001). Adaptace IHH také spouští syntézu tzv. stresových proteinů (např. HSP70), které během ischemie dočasně chrání důležité intracelulární struktury, takže činnost buňky může být po ukončení stresu obnovena (Iwaki et al., 1993).

Změny na molekulární úrovni jsou doprovázené fyziologickými změnami. Při adaptaci na IHH dochází mj. ke zvýšení hematokritu a koncentrace hemoglobinu, čímž se zlepšuje transportní kapacita krve pro kyslík (Monge & León-Velarde, 1991). K tomu přispívá také zvýšená angiogeneze (Tomanek et al., 2003). Myokard adaptovaný na vysokou nadmořskou výšku je tedy mnohem odolnější vůči projevům akutního I/R poškození. Navíc při vystavení organismu chronické hypoxii dochází i k adaptaci plic, při které se zvětšuje jejich aktivní povrch, plicní objem a difúzní kapacita plic pro výměnu plynů (Moret, 1980).

Na druhou stranu může mít adaptace na chronickou hypoxii i negativní účinky. Poškozuje kardiopulmonální systém, protože má opačný vliv na tělní a plicní krevní oběh. V tělním oběhu dochází k vazodilataci, zatímco v plicním oběhu dochází k vazokonstrikci. To vede k plicní hypertenzi a hypertrofii pravé srdeční komory (Ošťádal & Kolář, 2007). Adaptace na chronickou hypoxii také vyvolává polycytémii neboli trvalé zvýšení počtu červených krvinek a krevního barviva. Vlivem polycytémie se zvyšuje krevní viskozita, a tím i zátěž srdce (Ošťádal & Widimský, 1985). Adaptace na chronickou hypoxii je dále spojena se zvýšeným oxidačním stresem. Ten se na jednu stranu podílí na I/R poškození

normoxického myokardu a na patogenezi hypoxické plicní hypertenze, na druhou stranu díky aktivaci endogenních signálních kaskád působí mírný oxidační stres protektivně na myokard adaptovaný na chronickou hypoxii (Kolář & Ošťádal, 2004).

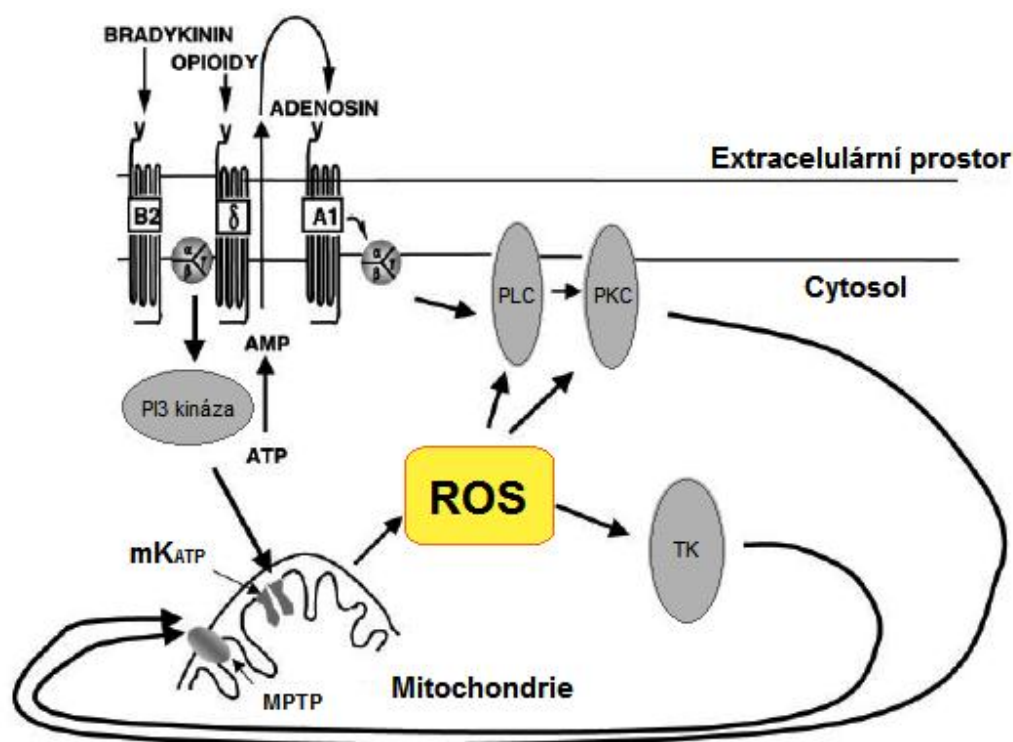
Adaptace organismu na IHH zvyšuje jeho schopnost udržet si odolnost vůči akutnímu nedostatku kyslíku poměrně dlouho po ukončení adaptace (týdny až měsíce), přičemž jednotlivé projevy adaptace přetrvávají různě dlouho. Nejrychleji (po dvou týdnech) se k normálním hodnotám vrací tělesná hmotnost, která je během adaptace snížena. Během dalších dvou týdnů se postupně snižuje množství hemoglobinu na hladinu před adaptací a mizí také hypertrofie pravé komory srdeční (Neckář et al., 2004; Ošťádal & Widimský, 1985).

I když je protektivní účinek adaptace na chronickou hypoxii znám poměrně dlouho, stále nebyl přesně objasněn jeho molekulární mechanismus (Wang et al., 2012). Objasnění signalizačních drah zapojených v adaptaci by mělo velký význam pro prevenci a léčbu kardiovaskulárních onemocnění člověka (Ošťádal & Kolář, 2007).

2.2.2 Signální dráhy aktivované adaptací na intermitentní hypobarickou hypoxii

Adaptace organismu na IHH je charakterizována strukturními a funkčními změnami zajišťujícími homeostázu buněk s minimálním výdejem energie. Tato přizpůsobení mohou chránit srdce za podmínek, které vyžadují zvýšení výkonu a následně i obrat metabolismu (Ošťádal & Kolář, 2007). Byla navržena celá řada molekulárních mechanismů, které by se mohly podílet na změnách srdce při IHH adaptaci. Předpokládá se, že jsou v této adaptaci zapojené podobné signální dráhy jako při ischemickém preconditioningu (viz obrázek 1).

Bylo zjištěno, že se v signálních drahách vyvolávajících kardioprotektivní účinky IHH uplatňují např. oxid dusnatý (NO) (Rouet-Benzineb et al., 1999), hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1), erythropoetin (Cai et al., 2003) a opioidní receptory (Pei et al., 2000). Naše laboratoř odhalila, že jsou do signalizace vyvolané adaptací na IHH zahrnuty i mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP (mK_{ATP}) (Neckář et al., 2002), proteinkináza C (PKC) (Hlaváčková et al., 2010; Neckář et al., 2005) a reaktivní formy kyslíku (ROS) (Kolář et al., 2007).



Obrázek 1: Signální dráhy aktivované ischemickým preconditioningem: Receptory pro bradykinin, opioidy a adenosin společně spouští signální dráhy tak, že prostřednictvím trimerních G proteinů aktivují PI3 kinázu a fosfolipázu C (PLC). PLC štěpí fosfolipidy a uvolňuje diacylglycerol, který následně aktivuje proteinkinázu C (PKC). Signální dráhy vedou k otevření mitochondriálních draslíkových kanálů závislých na ATP (mK_{ATP}) a brání otevření mitochondriálního póru (MPTP), které by vedlo k destrukci mitochondrie. Otevření mK_{ATP} přispívá ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou aktivovat PLC, PKC a tyrozinkinázu (TK), čímž šíří kardioprotektivní signál (Yellon & Downey, 2003).

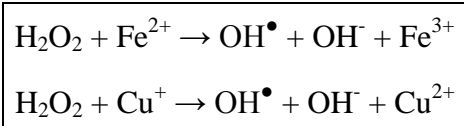
mK_{ATP} jsou kanály ve vnitřní mitochondriální membráně, které propouští K^+ ionty do mitochondriální matrix a jsou inhibovány fyziologickým množstvím ATP (Carreira et al., 2004). Během adaptace na IHH pravděpodobně dochází k otevření mK_{ATP} , které mohou následně přispět ke zvýšené tvorbě ROS. Jedním z enzymů, který by mohl vyvolat otevření mK_{ATP} je PKC (Neckář et al., 2002). V modelu IHH je nejspíše zapojena izoforma $PKC\delta$, jejíž zvýšená exprese byla pozorována v homogenátu i partikulární frakci myokardu potkana (Hlaváčková et al., 2010; Neckář et al., 2005). Další důležitou složkou signálních drah jsou ROS. Není přesně známo, v jakém pořadí se jednotlivé komponenty protektivních signálních kaskád ovlivňují. Výsledky ale naznačují, že zvýšená produkce ROS by mohla předcházet aktivaci $PKC\delta$ a mK_{ATP} (Kolář et al., 2007). Během adaptace na IHH se totiž díky opakujícím se intervalům hypoxie a reoxygenace zvyšuje množství ROS, a tedy i oxidační stres (Wang et al., 2011). Důkazem je snížení poměru redukovaného (GSH) k oxidovanému (GSSG) glutathionu, zvýšení lipidové peroxidace (Kolář et al., 2007) a zvýšené množství manganové superoxiddismutázy (MnSOD) v mitochondriích po

adaptaci na IHH (Balková et al., 2011). Experimenty s antioxidantem N-acetylcysteinem (NAC) ukázaly, že není-li míra oxidačního stresu příliš velká, působí ROS na srdce protektivně. Chronické podávání NAC potkanům během adaptace zrušilo pozitivní efekt IHH na velikost infarktu a současně snížilo množství PKC δ . ROS se tedy zdají být významnými signálními molekulami, které zprostředkovávají kardioprotektivní účinek adaptace na IHH (Kolář et al., 2007).

2.3 Reaktivní formy kyslíku

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi vznikem ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) a jejich odstraňováním. ROS a RNS byla dříve přisuzována pouze negativní úloha. Později se ale ukázalo, že se tyto molekuly uplatňují jako důležité součásti signálních drah za fyziologických i patologických stavů buňky. Jejich hladina proto musí být přísně regulovaná, k čemuž slouží široká škála antioxidačních enzymů a neenzymových antioxidantů.

Aerobní buňky produkují ROS jako vedlejší produkty metabolismu. Mezi ROS patří superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$) a hydroxylový radikál (OH^{\bullet}). $O_2^{\bullet-}$ není sám o sobě příliš reaktivní. Navíc nemůže procházet přes buněčné membrány, a proto působí pouze v místě svého vzniku. Ze dvou molekul $O_2^{\bullet-}$ může vzniknout H_2O_2 , který je málo reaktivní, ale má schopnost procházet přes buněčné membrány (Nordberg & Arnér, 2001). Na rozdíl od ostatních zástupců ROS vydrží H_2O_2 v buňce déle, což z něj dělá vhodnou signální molekulu (Yin et al., 2012). Na druhou stranu z H_2O_2 mohou vznikat reaktivnější molekuly, jako je $HOCl$, která vzniká činností myeloperoxidázy, a OH^{\bullet} , který vzniká ve Fentonově reakci, kde spolu reagují H_2O_2 a tranzitní kovy (viz obrázek 2). OH^{\bullet} je nejnebezpečnější molekulou ROS, protože způsobuje největší poškození buněčných struktur (Nordberg & Arnér, 2001).



Obrázek 2: Fentonova reakce (Nordberg & Arnér, 2001).

Nejvýznamnějším místem produkce ROS v buňce jsou mitochondrie, a to především komplex I a komplex III elektrontransportního řetězce. Dále mohou ROS vznikat činností NADPH oxidázy vázané na cytoplazmatické membráně, která předává

elektron z NADPH na molekulu kyslíku za vzniku $O_2^{\bullet-}$. Dalšími zdroji ROS jsou cytochrom P450, xantinoxidáza, pyruvátdehydrogenáza a monoaminoxidáza (Santos et al., 2011). ROS jsou také produkovány při metabolických reakcích kyseliny arachidonové (Kim et al., 2008).

Nepříznivým dopadem oxidačního stresu jsou především modifikace DNA, lipidů a proteinů. Ve struktuře proteinů jsou na redoxní stav buňky citlivé Cys, protože mezi nimi mohou v oxidačním prostředí vznikat intermolekulární a intramolekulární disulfidické můstky. Navíc thiolová skupina (SH) Cys podléhá oxidaci na kyselinu sulfenovou (SOH), sulfínovou (SO_2H) až sulfonovou (SO_3H) a tyto modifikace ovlivňují funkci proteinů a protein-proteinové interakce. Na zachování správné funkce proteinů se podílí řada antioxidačních enzymů, které redukují oxidované Cys (např. thioredoxiny) (Lillig et al., 2008).

ROS mají vliv i na strukturu fosfolipidových molekul. Fosfolipidy jsou amfipatické molekuly skládající se ze dvou hydrofobních řetězců a hydrofilního jádra. Hydrofobní část molekuly tvoří nasycené a nenasycené mastné kyseliny (FA). Nenasycené FA mohou díky svým dvojným vazbám snadno podléhat peroxidaci, která vede ke změně membránové fluidity, propustnosti pro ionty a ovlivňuje buněčnou signalizaci (Seleznev et al., 2006). Buňka ale disponuje reparačními mechanismy (např. deacylačně/reacylační cyklus), jejichž prostřednictvím může takto poškozené membrány opravit (Pérez et al., 2006).

2.3.1 Tempol

Tempol je nitrooxidová sloučenina, která působí jako antioxidant, protože prostřednictvím přenosu jednoho až dvou elektronů na molekulu ROS tvoří méně reaktivní molekuly. Svým působením tedy tempol chrání DNA, proteiny i lipidy před oxidačním poškozením (Wilcox & Pearlman, 2008). Antioxidační účinek tempolu spočívá jednak v přeměně $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 , jde tedy o mimetikum superoxiddismutázy (SOD). Rychlost této reakce je stejná jako při katalýze SOD, což znamená, že je tempol účinnějším antioxidantem než vitamíny. Kromě toho antioxidační účinky tempolu spočívají také v přeměně H_2O_2 na vodu, kdy imituje působení katalázy (CAT) (Wilcox, 2010). Navíc tempol může oxidací železa a mědi zabránit iniciaci Fentonovy reakce, ve které vzniká OH^{\bullet} , anebo může reagovat přímo s OH^{\bullet} . Publikace uvádějí pořadí afinity tempolu k jednotlivým ROS: $OH^{\bullet} > H_2O_2 > O_2^{\bullet-}$ (Wilcox & Pearlman, 2008).

Biologický význam tempolu spočívá zejména v jeho prostupnosti membránami, takže může reagovat nejen s extracelulárními, ale i intercelulárními ROS. Další výhodou

tohoto antioxidantu je rozpustnost ve vodě, což zlehčuje jeho aplikaci v experimentech (Simonsen et al., 2009).

Ze studií s tempolem vyplývá, že chrání myokard před I/R poškozením, snižuje krevní tlak a zabraňuje apoptóze (Wilcox, 2010). Na druhou stranu příliš vysoká koncentrace tempolu může být prooxidační, protože $O_2^{\bullet-}$, který je odstraňován tempolem, je schopen nejen iniciovat peroxidaci buněčných struktur, ale také ji ukončovat (Wilcox & Pearlman, 2008).

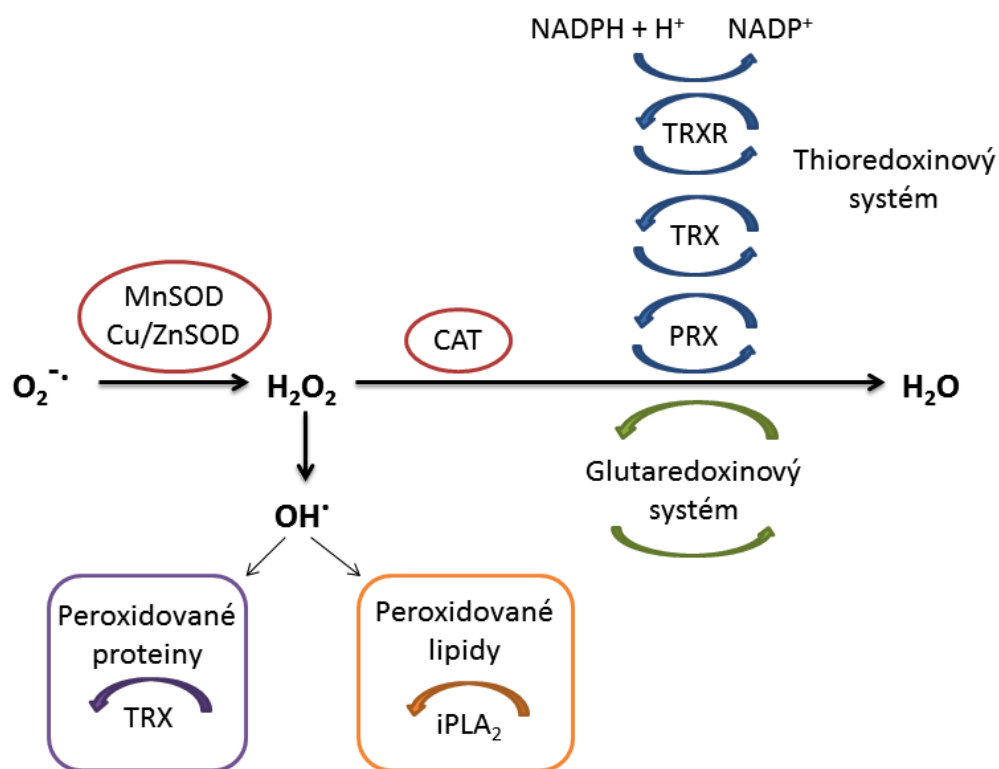
2.4 Antioxidační systém buňky

K obraně proti působení ROS a RNS slouží antioxidační systém buňky, do něhož patří neenzymové antioxidanty (např. α -tokoferol, kyselina askorbová) a antioxidační enzymy (např. SOD, CAT) (Nordberg & Arnér, 2001).

V první linii antioxidační obrany buňky stojí SOD, které katalyzují dizmutaci dvou molekul $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 a kyslík (viz obrázek 3). V savčích buňkách se vyskytují tři izoformy SOD, které se liší druhem metalického prvku jako kofaktoru. Ve většině buněk je nejvíce exprimována měď/zinková SOD (Cu/ZnSOD), která se nachází v cytosolu, jádru, peroxizómech a mitochondriích. Oproti tomu manganová SOD (MnSOD) se vyskytuje v mitochondriální matrix a je hlavním enzymem odstraňujícím $O_2^{\bullet-}$, které vznikají činností elektrontransportního řetězce (Qin et al., 2008). Exprese MnSOD je aktivována oxidačním stresem, což bylo potvrzeno podáním antioxidantu NAC, které snížilo její expresi (Balková et al., 2011). Třetí izoformou je extracelulární SOD obsahující stejně jako intracelulární Cu/ZnSOD měď a zinek (Qin et al., 2008).

H_2O_2 může být dále konvertován na vodu působením CAT (viz obrázek 3), která je lokalizovaná v peroxizómech, mitochondriální matrix a cytosolu. Její exprese v srdci je v porovnání s jinými tkáněmi nízká, což by mohlo být důvodem vysoké citlivosti srdce k oxidačnímu poškození (Zhou & Kang, 2000).

V buňkách také existují dva hlavní thiol-dependentní antioxidační systémy, tzv. glutaredoxinový a thioredoxinový systém (viz obrázek 3). Oba systémy fungují na podobném principu, při kterém jejich jednotlivé komponenty prochází cyklem oxidace a redukce a postupně předávají elektron od NADPH až na cílovou molekulu (např. oxidovaný protein, H_2O_2), čímž ji redukují (Ahsan et al., 2009). Navíc spolu tyto dva systémy kooperují, a to především v případech, kdy část jednoho z nich chybí (Lu & Holmgren, 2014).



Obrázek 3: Antioxidační systém buňky: Superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), který vzniká především činností mitochondriálního elektrontransportního řetězce, je přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2) pomocí manganové (MnSOD) a měď/zinkové superoxiddismutázy (Cu/ZnSOD). Vzniklý H_2O_2 může být dále konvertován na vodu (H_2O) působením katalázy (CAT), peroxiredoxinů (PRX) anebo antioxidačních enzymů z glutaredoxinového systému. Oxidované PRX jsou následně redukovány pomocí thioresoxinového systému, který zahrnuje thioresoxiny (TRX), thioresoxinreduktázy (TRXR) a NADPH. Na druhou stranu z H_2O_2 může vzniknout vysoce škodlivý hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), který poškozuje proteiny a lipidy. Na opravách těchto poškození se podílí mj. TRX a na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ (iPLA₂) (Ahsan et al., 2009; Nordberg & Arnér, 2001; Pérez et al., 2006).

Glutaredoxinový systém zahrnuje glutathionperoxidázy (GPX), glutaredoxiny, glutathion, glutathionreduktázy a NADPH (Lu & Holmgren, 2014). GPX katalyzují redukci H_2O_2 a hydroperoxidů na vodu a alkoholy (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Glutaredoxiny slouží jako donory elektronů pro ribonukleotidreduktázu, katalyzují redukci disulfidických můstků ve struktuře proteinů a také glutathionylaci i deglutathionylaci proteinů (Lillig et al., 2008). Další složka systému, glutathion, je neenzymový antioxidant, který může být v redukované formě, tj. GSH, nebo oxidované formě, tj. GSSG. Udržení správného poměru GSH/GSSG je pro buňku velmi významné a ukazuje na míru oxidačního stresu (Townsend et al., 2003). Nedílnou součástí glutaredoxinového systému jsou glutathionreduktázy, které redukují oxidované glutaredoxiny (Ahsan et al., 2009) a GSSG (Townsend et al., 2003).

2.5 Thioredoxinový systém

Buňka je kromě glutaredoxinového systému vybavena i thioredoxinovým systémem, který zahrnuje thioredoxiny (TRX), thioredoxinreduktázy (TRXR) a NADPH. TRX působí antioxidačně především prostřednictvím peroxiredoxinů (PRX) (Lu & Holmgren, 2014).

2.5.1 Peroxiredoxiny

PRX jsou malé antioxidační enzymy (22-27 kDa), které redukují H_2O_2 a hydroperoxydy na vodu a alkyldihydroperoxydy na alkoholy. Mají vyšší afinitu k H_2O_2 než CAT a GPX, a proto jsou významné při ochraně buňky před oxidačním stresem.

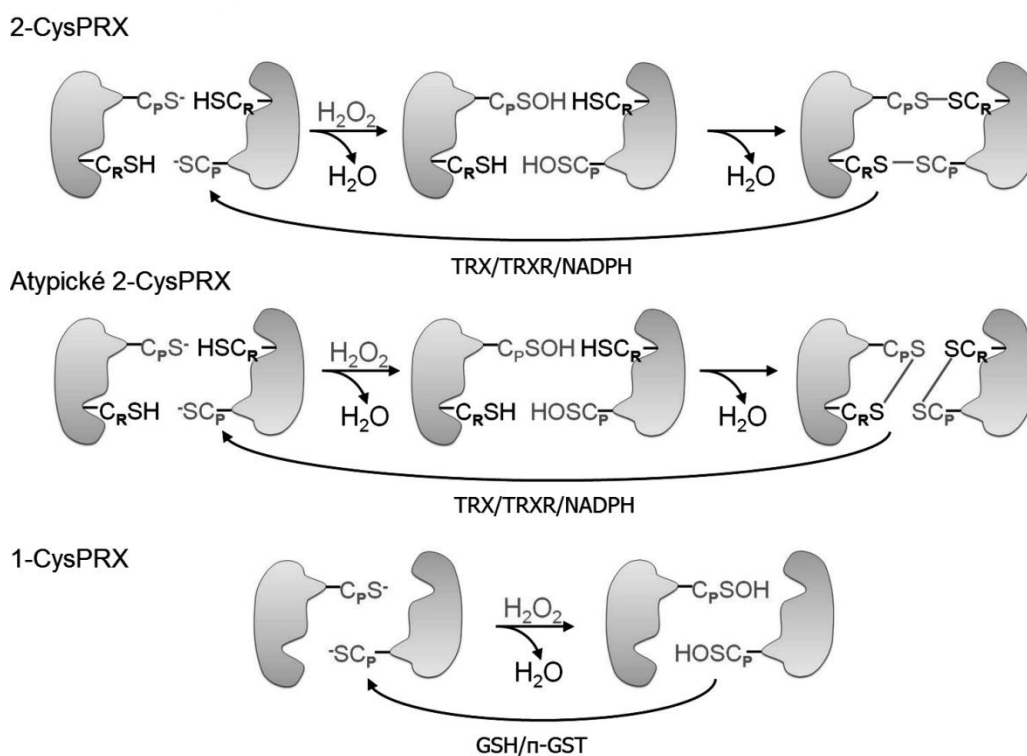
Existuje šest izoform PRX, které se podle počtu a pozice Cys využívaných pro katalýzu dělí do tří skupin (2-CysPRX, atypické 2-CysPRX, 1-CysPRX). Všechny PRX mají ve své struktuře konzervovaný Cys⁴⁷, označovaný C_P , který prochází cyklem peroxid-dependentní oxidace a thiol-dependentní redukce. Některé izoformy PRX mají navíc konzervovaný Cys¹⁷⁰, označovaný C_R (Rhee et al., 2005).

Mezi 2-CysPRX patří PRX1-PRX4. Tyto izoformy PRX mají na N i C konci konzervovaný Cys, tedy C_P i C_R , a fungují jako homodimery. H_2O_2 nejdříve oxiduje SH skupinu na C_P . Tím vzniká SOH, která následně reaguje s SH skupinou C_R na druhé molekule PRX, čímž vzniká intermolekulární disulfidický můstek (viz obrázek 4). Ten je poté redukován pomocí TRX, což zajišťuje, že PRX mohou pokračovat v redukci dalších substrátů. Jednotlivé 2-CysPRX se liší svou buněčnou lokalizací. PRX1, PRX2 se vyskytují v cytosolu a v jádru, kde mohou ovlivňovat transkripční faktory (např. c-Myc, NF- κ B) (Ishii et al., 2012). Oproti tomu PRX3 je mitochondriální protein. PRX4 se nachází v endoplazmatickém retikulu a může být sekretován z buňky do extracelulárního prostoru (Zhu et al., 2012).

Jediným zástupcem atypických 2-CysPRX je PRX5. Nachází se v cytosolu, mitochondriích, jádru a peroxizómech (Zhu et al., 2012). Stejně jako 2-CysPRX využívá pro katalýzu dva Cys, ale konzervovaný je pouze ten na N konci. Oxidovaný C_P tvoří intramolekulární disulfidický můstek s C_R stejné molekuly PRX5, takže funguje jako monomer. Redukce PRX5 probíhá pomocí TRX (viz obrázek 4).

Mezi 1-CysPRX patří pouze PRX6, který využívá pro katalýzu jen jeden Cys. Oxidovaný C_P je redukován pomocí GSH, který obsahuje SH skupinu, a glutathion S-transferázy (viz obrázek 4) (Rhee et al., 2012). PRX6 se od ostatních PRX liší i v dalších ohledech. Je jedinou izoformou PRX, která je schopná redukovat oxidované fosfolipidy.

Navíc má PRX6 kromě peroxidázové aktivity i aktivitu na kalcium nezávislé fosfolipázy A_2 (iPLA₂) s pH 4 optimem. Fosfolipázová aktivita PRX6 využívá katalytickou trojici Ser-His-Asp a způsobuje odštěpování mastných kyselin z druhého uhlíku fosfolipidů (Fisher, 2011). Je však třeba zdůraznit, že peroxidázová aktivita PRX6 je asi padesátkrát vyšší než iPLA₂ aktivita (Manevich & Fisher, 2005). PRX6 funguje jako antioxidant v cytosolu, kde je neutrální pH. Podílí se na redukci oxidovaných fosfolipidů, a pokud se společně s oxidačně modifikovanou membránou dostane do lyzozómu, tak je díky kyselému pH aktivována jeho iPLA₂ aktivita, a tak PRX6 začne hydrolyzovat fosfolipidy. Povaha aktivity PRX6 není závislá jen na hodnotě pH. Fosforylace PRX6 působením MAPK zvyšuje iPLA₂ aktivitu i ve vyšším pH. Naopak vazba surfaktantového proteinu A této aktivitě brání (Fisher, 2011). PRX6 je také ovlivněn ischemií, která vede k jeho translokaci z cytosolu do mitochondrií, kde stabilizuje jejich funkci (Eismann et al., 2009).



Obrázek 4: Mechanismus katalýzy jednotlivých skupin peroxiredoxinů (PRX): Oxidované 2-CysPRX a atypické 2-CysPRX jsou redukovány thioredoxinovým systémem, který se skládá z thioredoxinů (TRX), thioredoxinreduktáz (TRXR) a NADPH. Oproti tomu oxidované 1-CysPRX jsou redukovány pomocí glutathionu (GSH) a glutathion S-transferázy (π-GST) (Rhee et al., 2012).

2.5.2 Thioredoxiny

TRX jsou malé proteiny (12-18 kDa), které prostřednictvím tvorby disulfidických můstků redukují oxidované Cys ve struktuře PRX (viz obrázky 4 a 5), ale i dalších peroxidovaných proteinů. Existují tři izoformy TRX. TRX1 a TRX2 se vyskytují ve všech buňkách, zatímco třetí izoforma TRX je specifická pouze pro spermatidy (Maulik & Das, 2008).

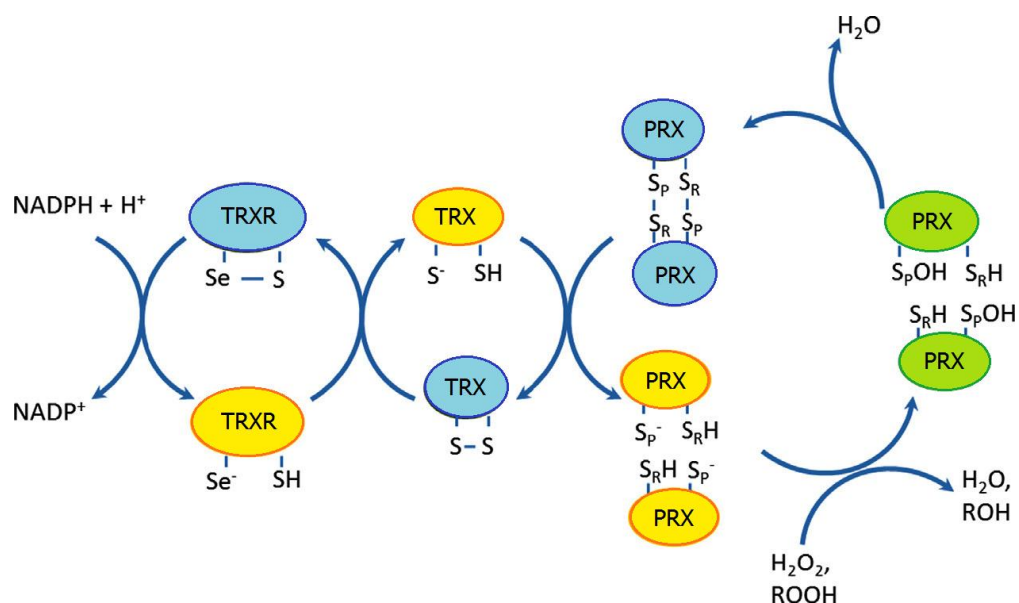
Nejvíce studovaným zástupcem TRX je TRX1, který obsahuje dva konzervované katalytické Cys (Cys³² a Cys³⁵), jejichž redoxní stav je klíčový pro jeho aktivitu. Lidský TRX1 má navíc další tři strukturně významné Cys (Cys⁶², Cys⁶⁹ a Cys⁷³), přičemž jejich modifikace (glutathionylace, oxidace a nitrosylace) také ovlivňují aktivitu tohoto enzymu.

TRX1 má mnoho funkcí, které se liší podle jeho buněčné lokalizace a interakce s dalšími proteiny. Slouží jako donor elektronů pro ribonukleotidreduktázu, která se podílí na syntéze DNA tím, že redukuje ribonukleotidy na deoxyribonukleotidy (Arnér & Holmgren, 2000). Dále TRX1 v cytoplazmě přispívá k udržení správného redoxního stavu buňky (Maulik & Das, 2008). Jednak udržuje PRX1 a PRX2 v redukované formě, a také redukuje Cys disulfidy a nitrothioly ve struktuře oxidačně modifikovaných proteinů (Santos et al., 2011). Tato redukce je rychlejší než redukce prostřednictvím GSH (Arnér & Holmgren, 2000). Navíc oxidační stres vyvolává translokaci TRX1 do jádra a zvyšuje jeho expresi prostřednictvím transkripčního faktoru Nrf2, který se váže na element citlivý na antioxidanty (ARE) ve struktuře genu TRX1 (Calvert et al., 2009). Dále TRX1 v jádru redukuje Cys ve struktuře transkripčních faktorů (např. NF-κB, AP-1 a HIF-1), a tím umožňuje jejich vazbu na DNA (Go & Jones, 2010).

Pro funkci TRX1 je obecně důležitý jeho redoxní stav. Redukovaný TRX1 obsahuje ve své struktuře SH skupiny a oxidovaný TRX1 obsahuje disulfidický můstek. Pouze redukováná forma TRX1 je schopna vazby na transkripční faktory a další proteiny (Arnér & Holmgren, 2000). Příkladem může být vazba TRX1 na kinázu regulující apoptózu (ASK1), která hraje esenciální roli v apoptóze indukované stresem. Vazbou TRX1 na ASK1 dochází k inhibici této kinázy, čímž TRX1 brání spuštění apoptotické kaskády. Za podmínek mírného oxidačního stresu se TRX1 vyskytuje spíše v redukované formě, čímž zabraňuje apoptóze. Při zvýšeném oxidačním stresu ale ROS způsobují oxidaci TRX1, čímž brání jeho vazbě na ASK1, a může tedy dojít k iniciaci procesů vedoucích k apoptóze (Saitoh et al., 1998).

TRX1 díky svému antioxidačnímu a antiapoptotickému působení přispívá k ochraně myokardu. Jeho zvýšená exprese zlepšuje postischemické obnovení srdeční

funkce a zmenšuje oblast zasaženou infarktem myokardu (Turoczi et al., 2003). Mimo to TRX1 stimuluje růst lymfocytů, fibroblastů a některých nádorových buněčných linií (Maulik & Das, 2008).



Obrázek 5: Thioredoxinový systém: Peroxiredoxiny (PRX) redukují peroxid vodíku (H₂O₂) a hydroperoxidy (ROOH), a samy se tak oxidují. Oxidované PRX jsou následně redukovány pomocí thioredoxinů (TRX). Poté jsou oxidované TRX redukovány thioredoxinreduktázami (TRXR) s využitím NADPH + H⁺ (Lu & Holmgren, 2014).

Obecně je TRX2 méně studovaným antioxidačním enzymem než TRX1. Má konzervované aktivní místo stejné jako TRX1, ale nemá další strukturní Cys. Na rozdíl od TRX1 má N koncovou sekvenci cílící do mitochondrií, která určuje jeho lokalizaci (Maulik & Das, 2008). Funkcí TRX2 je především redukce oxidovaného PRX3, čímž přispívá k ochraně buňky před ROS vznikajícími v mitochondriích (Ahsan et al., 2009). Navíc TRX2 může bránit iniciaci apoptotické kaskády třemi způsoby. Jednak jako zástupce antioxidačních enzymů snižuje oxidační stres, dále může obdobě jako TRX1 inhibovat ASK1 (Zhang et al., 2004) a v neposlední řadě přímou interakcí s cytochromem c brání jeho uvolnění z mitochondrií (Masutani et al., 2005).

2.5.3 Thioredoxinreduktázy

Další součástí thioredoxinového systému jsou TRXR, které pomocí NADPH redukují oxidované TRX (viz obrázek 5), ale i další substráty (např. lipidové hydroperoxidy a H₂O₂) (Ahsan et al., 2009).

TRXR vyšších eukaryot jsou 55-65 kDa velké, dimerní, selen-dependentní flavoproteiny příbuzné glutathionreduktázám. TRXR mají oproti glutathionreduktázám

navíc na C konci Sec, který je nezbytný pro jejich katalytickou aktivitu. TRXR ve své struktuře dále obsahuje FAD a NADPH vazebnou doménu. Elektrony jsou předávány z NADPH na FAD, dále na dithiolový motiv, z něj na selenylsulfid ve struktuře druhé podjednotky a konečně na disulfid substrátu (Nordberg & Arnér, 2001).

Obdobně jako u TRX existují tři izoformy TRXR. TRXR1 je lokalizovaná v cytosolu a jádru a redukuje TRX1. TRXR2 se nachází v mitochondriích, kde redukuje TRX2. Třetí izoforma TRXR, thioredoxin-glutaredoxinreduktáza, je exprimována pouze ve varlatech (Ahsan et al., 2009). Někdy je řazena ke glutaredoxinům, protože kromě FAD a NADPH vazebné domény obsahuje glutaredoxinovou doménu (Lu & Holmgren, 2014), takže je navíc schopná redukovat i GSSG. Aktivita thioredoxin-glutaredoxinreduktázy tedy poukazuje na propojení obou thiol-dependentních antioxidačních systémů (Nordberg & Arnér, 2001).

2.6 Enzymy metabolismu železa

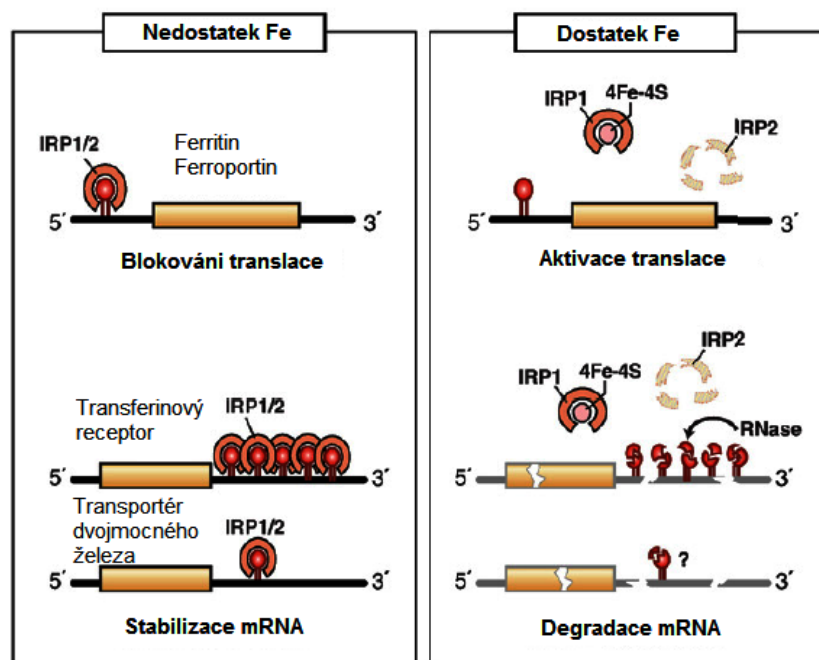
Pro buňku je důležité zachování rovnováhy antioxidačních a prooxidačních systémů. Prooxidačně působí řada enzymů (např. NADPH oxidáza, cytochrom P450 a xantinoxidáza), ale také volné železo (Fe) nebo hem. Fe je esenciálním prvkem pro všechna eukaryota a většinu prokaryot, protože je nezbytné pro aktivitu řady enzymů, fungování mitochondriálního elektrontransportního řetězce a transport kyslíku prostřednictvím hemoproteinů. Na druhou stranu může reverzibilní vazba molekuly kyslíku na atom Fe v hemoproteinech vést ke vzniku $O_2^{\bullet-}$, ze kterého mohou následně vznikat další ROS (Chepelev & Willmore, 2011). Kromě toho je volné Fe pro buňku toxické, protože se účastní Fentonovy reakce (viz obrázek 2), ve které vzniká velmi škodlivý OH^{\bullet} (Nordberg & Arnér, 2001).

V krvi je Fe transportováno prostřednictvím proteinu transferrinu. Komplex transferrin-Fe se může vázat na transferrinový receptor na plazmatické membráně. Fe se následně pomocí receptorem zprostředkované endocytózy dostane do endozomu a okyselením endozomu dojde k uvolnění Fe z transferrinu. Fe je poté redukováno z oxidačního stavu Fe^{3+} na Fe^{2+} a je dále transportováno přes endozomální membránu pomocí transportéru Fe^{2+} . V cytosolu může být Fe využito různými cestami. Jednak může být inkorporováno do železo-sírných (Fe-S) klastrů nebo transportováno do mitochondrie pomocí mitoferrinu, dále může být vyvázáno ferritinem či transportováno ven z buňky pomocí transportéru ferroportinu. Mitochondrie jsou hlavním místem spotřeby Fe, protože

v nich vzniká hem a Fe-S klastry, které jsou nezbytné pro funkci mitochondriálního elektrontransportního řetězce (Ye & Rouault, 2010).

Kvůli významu Fe pro funkci buňky, ale i kvůli toxicitě volného Fe, musí být přísně regulován jeho metabolismus. To zajišťují proteiny regulující Fe (IRP), které mají dvě izoformy (IRP1 a IRP2). Obě izoformy IRP se při nedostatku Fe v buňce váží na element citlivý na Fe (IRE) v nepřekládané oblasti mRNA proteinů účastnících se metabolismu Fe. Navíc se IRP mohou vázat i na IRE v mRNA proteinů Krebsova cyklu, cytoskeletu a hypoxií indukovaného faktoru 2 α (HIF-2 α).

Pro regulaci exprese výše uvedených proteinů je klíčové, zda se IRE nachází na 5' nebo 3' konci mRNA. Pokud se IRP váží na IRE na 5' konci mRNA, brání translaci těchto proteinů. Naopak vazba IRP na IRE na 3' konci mRNA nukleovou kyselinu stabilizuje, protože maskuje sekvenci pro degradaci mRNA. IRP tímto způsobem zajišťují zvýšení intracelulární koncentrace Fe. Je-li totiž v buňce málo Fe, IRP se váží mj. na 5' konec mRNA pro ferritin a ferroportin, čímž blokuje jejich translaci. Fe tedy není ani vyvazováno na ferritin ani transportováno ven z buňky ferroportinem. Navíc IRP se současně váží na 3' konec mRNA transferrinového receptoru a transportéru Fe²⁺, čímž brání její degradaci, takže je Fe více transportováno do cytosolu (viz obrázek 6).



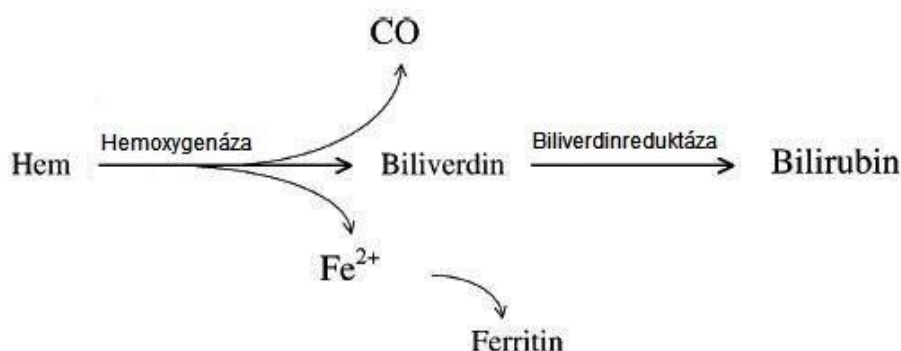
Obrázek 6: Regulace exprese proteinů účastnících se metabolismu železa (Fe) pomocí proteinů regulujících železo (IRP) v závislosti na množství Fe v buňce: Při nedostatku Fe se IRP váží na mRNA, zatímco při dostatku Fe je této vazbě bráněno vložení železo-sírného klastu [4Fe-4S] do struktury IRP1 a degradací IRP2 (Anderson et al., 2012).

Na druhou stranu, je-li v buňce dostatek Fe, IRP se neváží na IRE, což je zajištěno různými způsoby v závislosti na izoformě IRP (viz obrázek 6). Do struktury IRP1 je při dostatku Fe vložen Fe-S klastr, čímž IRP1 ztrácí schopnost vázat IRE, ale zároveň získává enzymovou aktivitu akonitázy (ACO). Oproti tomu IRP2 je při dostatku Fe degradován E3 ubiquitinligázou, která pro svou aktivitu vyžaduje vazbu Fe (Anderson et al., 2012).

2.6.1 Hemoxygenázy

Významnou součástí metabolismu Fe jsou hemoxygenázy (HO). Jde o 32-36 kDa mikrozomální proteiny, které jsou rychlost limitujícími enzymy degradace hemu. HO katalyzují tříkrokovou oxidaci hemu na biliverdin, přičemž využívají tři molekuly kyslíku a sedm elektronů. Biliverdin je následně ihned redukován na bilirubin působením biliverdinreduktázy. Při reakci katalyzované HO se také uvolňuje oxid uhelnatý (CO) a Fe^{2+} iont (viz obrázek 7).

Jsou známy tři izoformy HO. Výzkumy se nejvíce zaměřují na HO1, neboli stresový protein HSP32. HO1 je inducibilní enzym a její exprese je indukovaná např. oxidačním stresem, zánětem, přítomností volného hemu nebo nedostatkem Fe. Oproti tomu HO2 a HO3 jsou konstitutivně exprimované proteiny. HO2 se nachází především v nervové soustavě a varlatech, zatímco HO3 je specifická pro mozek (West & Oates, 2008).



Obrázek 7: Schéma reakce katalyzované hemoxygenázou (HO) a biliverdinreduktázou: Po působení HO na hem dochází ke vzniku biliverdinu, oxidu uhelnatého (CO) a kationtu železa (Fe^{2+}), který dále stimuluje expresi ferritinu. Biliverdin je následně přeměněn na bilirubin za katalýzy biliverdinreduktázy (Morse & Choi, 2005).

HO1 působí antioxidačně, antiapoptoticky a protizánětlivě. Antioxidační účinek HO1 spočívá jednak v degradaci volného hemu, který je toxický, protože způsobuje oxidaci proteinů, lipidů a DNA. Dále HO1 uvolňuje biliverdin, ze kterého následující reakcí vzniká silný antioxidant bilirubin (Unno et al., 2012). Ten může přímo vychytávat

oxidanty (např. O_2^{\bullet}) a také brání jejich vzniku inhibicí NADPH oxidázy (Hosick & Stec, 2012). Bilirubin může současně působit antiapoptoticky, protože zabraňuje oxidaci lipidů a oxidačnímu poškození mitochondrií (Clark et al., 2000b). Navíc HO1 při svém působení uvolňuje CO, který je důležitou signální molekulou a působí podobně jako oxid dusnatý (NO). Na rozdíl od NO ale není CO volným radikálem (Hosick & Stec, 2012). CO působí antiapoptoticky a protizánětlivě prostřednictvím ovlivnění MAPK kaskády (Morse & Choi, 2005).

Gen pro HO1 obsahuje řadu elementů pro vazbu transkripčních faktorů, z nichž některé jsou aktivované oxidačním stresem. Jedná se o transkripční faktory z rodiny AP-1, NF- κ B, HIF-1 a Nrf2 (Morse & Choi, 2002). HIF-1 má navíc vliv i na indukibilní NO syntázu, a tak koordinuje signalizaci zprostředkovanou druhými posly CO a NO. Oba tyto plyny stimulují guanylátcyklázu, která produkuje další signální molekulu, cyklické GMP, které mj. vyvolává vazodilataci cév, čímž chrání srdce před I/R poškozením. V mnoha tkáních, především v srdci, bylo pozorováno, že NO zvyšuje expresi HO1. CO uvolňované působením HO1 poté snižuje expresi indukibilní NO syntázy, a zpětnou vazbou tak brání přílišné produkci reaktivního NO (Haines et al., 2012).

HO2 na rozdíl od HO1 obsahuje dvě vazebná místa pro hem, a proto se významně podílí na udržení jeho hladiny v buňce (Han et al., 2005). Tato izoforma je exprimována především v nervové soustavě, kde uvolňovaný CO slouží jako neurotransmiter (Christou et al., 2000). Dále se HO2 vyskytuje v buňkách nervového původu v karotidovém tělísku, ve kterém se podílí na senzitivě vůči koncentraci kyslíku v krvi (Han et al., 2005), přičemž snížená hladina kyslíku inhibuje aktivitu HO2 a snižuje množství uvolněného CO (Prabhakar, 2012).

Nicméně HO kromě antioxidačních molekul uvolňují i prooxidační Fe. To ale indukuje expresi ferritinu, který Fe vychytává, a působí tak antioxidačně (Morse & Choi, 2002). Další možností, jak chránit před působením volného Fe, je jeho zabudování do Fe-S klastrů. Existují [2Fe-2S] klastry, které se mohou vyskytovat např. ve struktuře glutaredoxinů, nebo [4Fe-4S] klastry, které obsahují mj. akonitázy (ACO). Obecně jsou ale všechny enzymy obsahující Fe-S klastry náchylné k oxidačnímu stresu, který může vyvolat rozpad klastru, a tím uvolnění Fe (Cantu et al., 2011).

2.6.2 Akonitázy

Dalšími enzymy účastnicími se metabolismu Fe jsou ACO, které katalyzují přeměnu citrátu na izocitrát. V buňkách se vyskytují dvě izoformy ACO (ACO1 a ACO2), které ve své struktuře obsahují [4Fe-4S] klastr, ale liší se lokalizací v buňce (Anderson et al., 2012).

ACO1 je 98 kDa cytosolický enzym, ale za určitých podmínek (např. nedostatek Fe, oxidační stres) může translokovat na membrány endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Christova & Templeton, 2007; Patton et al., 2005). Úloha ACO1 vázané na membrány není dosud přesně známa, ale v cytosolu plní tento enzym dvě odlišné funkce. Jednak hraje důležitou roli v metabolismu Fe, protože při nedostatku Fe v buňce ACO1 ztrácí [4Fe-4S] klastr. Tím se z ní stává regulační protein IRP1, který se váže na IRE různých mRNA (Anderson et al., 2012). Na druhou stranu pokud ACO1 ve své struktuře obsahuje [4Fe-4S] klastr, tak katalyzuje přeměnu citrátu na izocitrát, který v cytosolu slouží jako donor elektronů pro cytosolickou izocitrátdehydrogenázu. Ta redukuje NADP^+ na NADPH, takže se ACO1 podílí na udržení správné hladiny NADPH v cytosolu (Minich et al., 2003).

Další izoformou ACO je mitochondriální ACO2 (85 kDa), která je jednak součástí Krebsova cyklu, kde primárně katalyzuje přeměnu citrátu na izocitrát (Cantu et al., 2011), a jednak tvoří komplex s mitochondriální DNA (Chen et al., 2007). ACO2 na rozdíl od ACO1 neplní funkci IRP, ale je naopak regulována IRP. mRNA pro ACO2 totiž obsahuje 5' koncové IRE, což znamená, že při nedostatku Fe vazba IRP na IRE blokuje translaci ACO2.

Antioxidační úloha ACO spočívá ve vázání prooxidačního Fe v [4Fe-4S] klastru. Nicméně tento klastr je sám o sobě citlivý na oxidační zátěž. ACO2 je díky své lokalizaci v mitochondriích náchylnější k oxidačnímu poškození. Proto bývá inaktivace tohoto enzymu využívána jako jeden z markerů oxidačního stresu (Cantu et al., 2011).

2.7 Fosfolipázy A_2

Fosfolipázy A_2 (PLA_2) katalyzují hydrolýzu esterové vazby na druhém uhlíku glycerolu v molekule fosfolipidů, čímž vzniká volná mastná kyselina (FA) a 2-lyzofosfolipid. Oba dva produkty hydrolytické reakce se mohou uplatnit v signalizaci. PLA_2 se dělí do šesti skupin podle závislosti na kalciu, molekulové hmotnosti, druhu aminokyselin v aktivním centru a preference pro substrát. Jsou to sekretované PLA_2 , cytosolické PLA_2 , na kalciu nezávislé PLA_2 (iPLA_2), krevní destičky aktivující faktor

acetylhydrolázy, lyzozomální PLA₂ a nedávno objevené adipocytární PLA₂ (Dennis et al., 2011).

V myokardu se nejhojněji vyskytují iPLA₂, které tvoří až 80 % aktivity PLA₂ v srdečním svalu (McHowat & Creer, 2004). Navíc funkce iPLA₂ úzce souvisí s oxidačním stresem, protože z fosfolipidů preferenčně odštěpují oxidačně modifikované FA (White & McHowat, 2007).

2.7.1 Na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂

iPLA₂ jsou 84-90 kDa enzymy, jejichž aktivita je nezávislá na Ca²⁺ iontech a v aktivním centru obsahují katalytickou dvojici Ser-Asp. Patří mezi ně šest izoform – iPLA₂β, iPLA₂γ, iPLA₂δ, iPLA₂ε, iPLA₂ζ a iPLA₂η (Dennis et al., 2011). V srdeční tkáni se vyskytují především izoformy iPLA₂β a iPLA₂γ a jejich správná regulace je nezbytná pro udržení integrity membrány, funkci iontových kanálů a energetiku kardiomyocytů (Cedars et al., 2009).

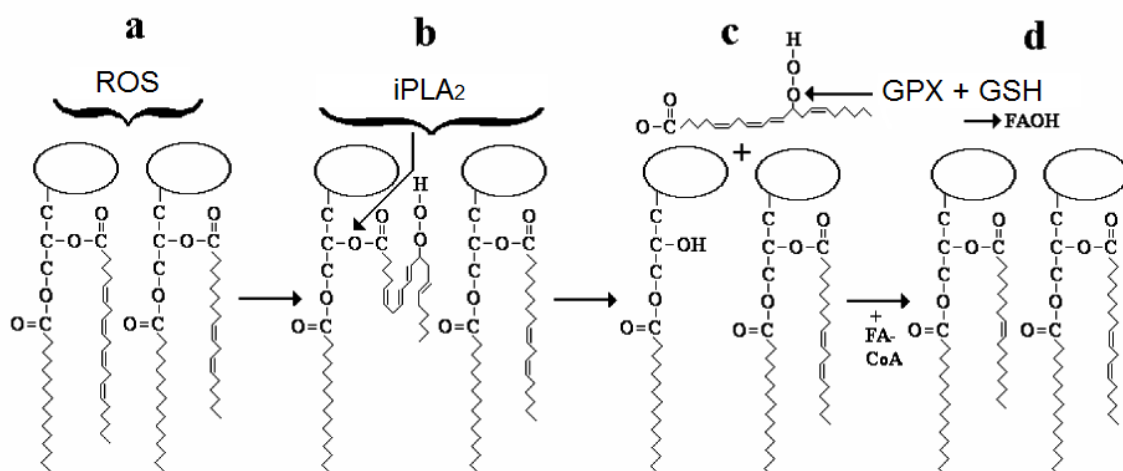
iPLA₂β má molekulovou hmotnost 85 kDa a vyskytuje se v cytosolu a mitochondriích. Ve své struktuře obsahuje sedm až osm ankyrinových repeticí a je jedinou PLA₂ s ATP vazebnou doménou. Vazba ATP stabilizuje iPLA₂β a chrání Cys v její struktuře před oxidací. Obecně totiž PLA₂ ve své struktuře obsahují neobvykle významný podíl Cys (více než 10 % aminokyselin). iPLA₂β sice pro aktivitu ani pro vazbu na membránu nepotřebuje Ca²⁺ ionty, nicméně může být nepřímo regulována množstvím Ca²⁺ iontů v buňce, a to prostřednictvím Ca²⁺-dependentního kalmodulinu, který ji inhibuje (Dennis et al., 2011). iPLA₂β je dále ovlivněna ischemií, která ji aktivuje a způsobuje její translokaci na mikrozomální membrány (Cedars et al., 2009). Během ischemie se také zvyšuje koncentrace acyl-koenzym A řetězců, které se váží na iPLA₂β, a tím ruší její kalmodulinem zprostředkovanou inhibici. Navíc bylo prokázáno, že zvýšení aktivity iPLA₂β za ischemických podmínek vede k rozvoji srdečních arytmií (Jenkins et al., 2009).

iPLA₂γ je 90 kDa enzym, který je lokalizován v mitochondriích a peroxizómech. Z řady výzkumů plyne, že správná hladina iPLA₂γ je nezbytná pro udržení homeostáze membránových fosfolipidů a funkci mitochondrií v kardiomyocytech (Mancuso et al., 2007; Moon et al., 2012). Deregulace exprese nebo aktivity iPLA₂γ totiž způsobuje změny ve fosfolipidovém složení mitochondrií a může prostřednictvím produktů hydrolytické reakce ovlivnit buněčnou signalizaci (Cedars et al., 2009).

Význam iPLA₂ pro fyziologickou funkci buňky spočívá především v účasti v tzv. deacylačně/reacylačním cyklu (viz obrázek 8). Principem tohoto cyklu je nejprve

deacylace FA z druhého uhlíku molekuly fosfolipidu za katalýzy iPLA₂. Spolu s volnou FA vzniká 2-lyzofosfolipid, který může být následně reacylován jinou FA pomocí lyzofosfolipid-acyltransferáz a transacyláz za účasti koenzymu A a za spotřeby ATP (Pérez et al., 2006).

Důležitost iPLA₂ v tomto cyklu spočívá zejména v jejich preferenční hydrolyze oxidačně modifikovaných FA ve struktuře fosfolipidů. Peroxidované FA musí být nejdříve hydrolyzovány působením iPLA₂, aby pak mohly být redukovány pomocí glutathionperoxidáz (GPX) a glutathionu (GSH). Jedinou GPX, která je schopna redukovat peroxidované FA vázané ve struktuře fosfolipidu, je GPX4. Její aktivita je ale v porovnání s ostatními GPX nízká (McHowat et al., 2001b).



Obrázek 8: Průběh deacylačně/reacylačního cyklu: Nejprve reaktivní formy kyslíku (ROS) peroxidují mastné kyseliny (FA) v molekule fosfolipidu (a). Následuje odštěpení peroxidované 2-FA prostřednictvím na kalcium nezávislých fosfolipáz A₂ (iPLA₂) (b). Poté glutathionperoxidázy (GPX) s využitím glutathionu (GSH) redukují uvolněnou peroxidovanou FA (c). Posledním krokem je reacylace 2-lyzofosfolipidu acylkoenzymem A příslušné FA (FA-CoA) (d) (Chakraborti, 2003).

iPLA₂ se na jednu stranu účastní deacylačně/reacylačního cyklu, a podílejí se tak na opravách peroxidovaných fosfolipidových molekul. Na druhou stranu za patologických podmínek (např. ischemie) může jejich nadměrná aktivita poškozovat srdeční buňky. iPLA₂ totiž pouze deacyluje FA z fosfolipidů, protože buňka nemá dostatek ATP na jejich zpětnou reacylaci (Pérez et al., 2006). Navíc jejich nadměrným působením může docházet k uvolňování nenasycených FA (kyseliny arachidonové, kyseliny dihomo- γ -linolenové a kyseliny eikosapentaenové), ze kterých mohou následně vznikat eikosanoidy, čímž iPLA₂ přispívají k rozvoji zánětlivých procesů (Jenkins et al., 2009). Ve studiích s bromenollaktonem (BEL), který je specifickým inhibítoem iPLA₂, bylo prokázáno, že

inhibice iPLA₂ vede ke zmenšení oblasti poškozené infarktem myokardu (Mancuso et al., 2003; Williams & Gottlieb, 2002). Obdobně ROS a RNS mohou inhibovat hydrolytickou aktivitu iPLA₂ tím, že oxidačně modifikují Cys zbytky v její struktuře (Song et al., 2006).

3 Cíle diplomové práce

Byly stanoveny následující cíle diplomové práce:

- 1) Zavedení stanovení relativního množství HPRT1 v myokardu potkana metodou imunodetekce pomocí specifické protilátky a zjištění, zda lze použít jako housekeeping protein pro model IHH.
- 2) Zavedení stanovení relativního množství antioxidantních enzymů (PRX6, TRX1, TRX2, TRXR1) a enzymů metabolismu železa (HO1, HO2, ACO1, ACO2) metodou imunodetekce pomocí specifické protilátky v myokardu potkana za normoxických a IHH podmínek.
- 3) Sledovat relativní zastoupení PRX6, TRX1, TRX2 a TRXR1 v normoxickém a na IHH adaptovaném myokardu levé komory potkana.
- 4) Zavedení imunofluorescenční lokalizace TRX1 v kardiomyocytech za normoxických podmínek a po adaptaci na IHH.
- 5) Sledovat relativní zastoupení HO1, HO2, ACO1 a ACO2 v normoxickém a na IHH adaptovaném myokardu levé komory potkana.
- 6) Sledovat vliv antioxidantu tempolu na relativní zastoupení iPLA₂ v myokardu levé komory normoxického a na IHH adaptovaného potkana.

4 Materiál a metody

4.1 Laboratorní zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci kmene Wistar. Zvířata byla krmena standardní laboratorní dietou a měla neomezený přístup k pitné vodě. Studie probíhala ve shodě s Vyhláškou o chovu a využití pokusných zvířat (311/1997 Sb.) a byla schválena Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky.

4.2 Experimentální model intermitentní hypobarické hypoxie

4.2.1 Efekt intermitentní hypobarické hypoxie

Potkani byli rozděleni do dvou experimentálních skupin. Jedna z nich byla adaptována na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH), která simuluje pobyt v nadmořské výšce 7 000 m n. m. (hypoxie), zatímco druhá skupina byla chována v normoxických podmínkách (kontrola).

- Podmínky hypoxie:
 - Adaptace probíhala v hypobarické komoře 8 hodin denně, 5 dní v týdnu, v celkovém počtu 25 expozičních.
 - Barometrický tlak (P_B), potažmo parciální tlak kyslíku (PO_2), byl snižován postupně, přičemž výšky 7 000 m n. m. ($P_B = 308$ mm Hg, 41 kPa; $PO_2 = 65$ mm Hg, 8,6 kPa) bylo dosaženo po 13 expozičních.
 - V průběhu adaptace byla zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla vnější ventilací regulována v rozmezí 21-23 °C.
- Podmínky normoxie:
 - Kontrolní zvířata byla po stejnou dobu chována v normoxických podmínkách odpovídajících výšce 200 m n. m. ($P_B = 742$ mm Hg, 99 kPa; $PO_2 = 155$ mm Hg, 20,7 kPa).

4.2.2 Vliv tempolu

Antioxidant tempol byl rozpuštěn v pitné vodě ($c = 26$ mg/kg/den) a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,4.

Potkani byli rozděleni do čtyř experimentálních skupin, z nichž dvě byly adaptovány na IHH a dvě byly chovány v normoxických podmínkách (viz výše). Jedné skupině potkanů adaptovaných na IHH a jedné normoxické skupině byl denně podáván

tempol rozpuštěný v pitné vodě. Druhé skupině potkanů adaptovaných na IHH a druhé skupině kontrolních potkanů byla denně podávána voda bez tempolu.

- Experimentální skupiny:
 - Kontrola bez tempolu
 - Kontrola s tempolem
 - Hypoxie bez tempolu
 - Hypoxie s tempolem

4.2.3 Odběr tkáně k analýzám

Zvířata byla usmrcena den po poslední hypoxické expozici dekapitací. Srdce byla rychle vyjmuto a omyta ve vychlazeném fyziologickém roztoku.

Srdce určená pro analýzy relativního množství antioxidantních enzymů, enzymů metabolismu železa a na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ byla následně rozdělena na pravou komoru, levou komoru (LV) a septum a jednotlivé části byly zváženy. LV byla ihned zamrazena a uložena v tekutém dusíku do dalšího použití.

Srdce určená k imunofluorescenční analýze thioredoxinu 1 byla ihned po vyjmutí z těla zavěšena na Langendorffův aparát. Další postup probíhal v těchto krocích:

- Krátké promytí myokardu roztokem Tyrode bez Ca²⁺ iontů (135 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,33 mM NaH₂PO₄; 5 mM MgCl₂·6 H₂O a 10 mM HEPES).
- Fixace 4% roztokem formaldehydu v PBS pufru (fosfátový pufr: 136,8 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄ a 1,8 mM KH₂PO₄) po dobu 3 minut.
- Sejmutí srdce z Langendorffova aparátu a odstřížení síní.
- Fixace komor v 4% roztoku formaldehydu v PBS pufru po dobu 2 hodin.
- Inkubace komor v 20% roztoku sacharózy v PBS pufru přes noc při teplotě 4 °C.
- Příčné odříznutí spodní třetiny myokardu a její krátké zamražení v tekutém dusíku.
- Skladování takto upravené tkáně při teplotě -80 °C.

4.3 Zdroje používaných chemikálií

Použité chemikálie a jejich zdroje jsou shrnuty v tabulce 1. Chemikálie jsou vždy rozpouštěny v redestilované vodě, pokud není uvedeno jinak.

Tabulka 1: Použité chemikálie a jejich zdroj

Zdroj	Název chemikálie
Abcam	oslí sérum (Normal Donkey Serum)
Bio-Rad	BSA (hovězí sérový albumin) standard o koncentraci 2 mg/ml, kaleidoskopický standard (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard), nízkomolekulární standard (Prestained SDS-PAGE Standard)
Boehringer Mannheim	Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid)
Fluka	TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin), DMSO (dimethylsulfoxid)
Lach-Ner	methanol, NaCl (chlorid sodný), sacharóza
Lachema	glycerol, H ₂ O ₂ (peroxid vodíku), KCl (chlorid draselný), KH ₂ PO ₄ (dihydrogenfosforečnan draselný), Na ₂ HPO ₄ (hydrogenfosforečnan disodný), NaH ₂ PO ₄ (dihydrogenfosforečnan sodný), MgCl ₂ ·6 H ₂ O (hexahydrát chloridu hořečnatého), persíran amonný
Life Technologies	ProLong [®] Gold Antifade Reagent s DAPI
Sigma-Aldrich	30% akrylamid/bis-akrylamid, aprotinin, BPB (bromfenolová modř), β-merkptoethanol, činidlo Bradfordové, DTT (dithiothreitol), EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), EGTA (kyselina ethylenglykoltetraoctová), fenylmethylsulfonylfluorid, glycerol-3-fosfát, glycin, HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetansulfonová), kozi sérum (Goat Serum), kyselina p-kumarová, leupeptin, luminol, marker molekulových hmotností (Prestained Molecular Weight Marker), orthovanadát sodný, SDS (dodecylsulfát sodný), Triton X-100, Tween 20
Spolana	NaF (fluorid sodný)
Thermo Scientific	formaldehyd bez methanolu (16%), SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate
USB Products	Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)

4.4 Stanovení relativního množství proteinů

4.4.1 Homogenizace srdeční tkáně

Pro přípravu vzorků k experimentům byl homogenizován myokard LV v následujících krocích:

- Rozdrcení tkáně v tekutém dusíku na prášek.
- Další kroky homogenizace probíhají při stálé teplotě 6 °C.
- Přídavek osminásobku vychlazeného homogenizačního pufru se sacharózou oproti hmotnosti tkáně (12,5 mM Tris-HCl (pH 7,4); 250 mM sacharóza; 2,5 mM EGTA; 1 mM EDTA; 100 mM NaF; 0,3 mM fenylmethylsulfonylfluorid; 6 mM β -merkaptoethanol; 10 mM glycerol-3-fosfát; 0,2 mM leupeptin; 0,02 mM aprotinin a 0,1 mM orthovanadát sodný).
- Homogenizování suspenze rozdrcené tkáně s homogenizačním pufrem pomocí skleněných homogenizačních kuliček (průměr 1,7-2,1 mm) kuličkovým homogenizátorem Retsch MM200 nastaveným na frekvenci 30 Hz po dobu 10 minut.
- Posléze rozpipetování vzorků na část pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích a na část pro stanovení relativního množství proteinů metodou Western blot.

4.4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou dle Bradfordové, během níž dochází k vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue na proteiny, a to především na jejich aromatické aminokyseliny. Při této vazbě dochází k přeměně formy barviva na jeho stabilnější formu, což je provázeno změnou absorpance vzorku (Bradford, 1976). Stanovení bylo provedeno pomocí fluorometru Varioskan (Thermo Scientific) v 96-jamkových destičkách v následujícím postupu:

- Provedení kalibrace:
 - Nanesení 10 μ l blanku (redestilovaná voda) a 10 μ l standardů s různými koncentracemi BSA ($c = 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800$ a $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$) na destičku.
 - Přidání 250 μ l činidla Bradfordové do jamek s blankem a do všech jamek se standardy.
 - Inkubace 10 minut.
 - Změření hodnot absorpance blanku a standardů fluorometrem.
 - Sestrojení kalibrační křivky.

- Nanesení naředěných vzorků určených k analýzám – 10 µl na jamku (ředění bylo zjišťováno empiricky).
- Přidání 250 µl činidla Bradfordové do jamek se vzorky.
- Inkubace 10 minut.
- Změření absorbance vzorků určených k analýzám fluorometrem snížené o blank.
- Odečtení koncentrace proteinů ve vzorcích z kalibrační křivky.
- Každé měření prováděno v tripletu. Koncentrace všech vzorků byla stanovena minimálně 6krát.

4.4.3 SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE je založena na principu dělení proteinů v polyakrylamidovém gelu podle jejich molekulové hmotnosti pomocí elektrického proudu, který gelem prochází. SDS slouží k denaturaci proteinů a současně uděluje proteinům záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti (Alberts et al., 2002). Elektroforéza byla provedena s příslušenstvím Mini-PROTEAN[®] 3 Cell od firmy Bio-Rad dle manuálu. Nejprve byly v následujících krocích připraveny gely pro rozdělení proteinů:

- Nalítí vhodného dělicího gelu (složení viz tabulka 2) mezi sklíčka v aparatuře na přípravu gelů cca 1,5 cm pod okraj a převrstvení malým množstvím redestilované vody. Koncentrace polyakrylamidu v dělicím gelu byla stanovena podle molekulové hmotnosti analyzovaného proteinu:
 - 8%: ACO1, ACO2
 - 10%: TRXR1, iPLA₂
 - 12%: HO1, HO2
 - 15%: HPRT1, PRX6, TRX1, TRX2
- Polymerace dělicího gelu po dobu přibližně 45 minut.
- Odsátí redestilované vody filtračním papírem.
- Nalítí 4% startovacího gelu (složení viz tabulka 2) a zasunutí hřebenu na vytvoření nanášecích jamek.
- Polymerace startovacího gelu po dobu přibližně 20 minut.
- Vyjmutí hřebenu a propláchnutí jamek redestilovanou vodou.
- Vyjmutí sklíček s gely a jejich vložení do aparatury na elektroforézu.

Tabulka 2: Složení gelů

Dělicí gel

	8%	10%	12%	15%
30% akrylamid/bis-akrylamin (ml)	2,66	3,32	3,98	3,75
1,5 M roztok Tris; 0,4% SDS; pH 8,8 (ml)	2,49	2,49	2,49	1,875
redestilovaná voda (ml)	4,81	4,15	3,49	1,875
TEMED (μl)	7	7	7	5
10% persíran amonný (μl)	70	70	70	50

Startovací gel

	4%
30% akrylamid/bis-akrylamin (ml)	0,65
0,5 M roztok Tris; 0,4% SDS; pH 6,8 (ml)	1,25
redestilovaná voda (ml)	3,05
TEMED (μl)	5
10% persíran amonný (μl)	50

Během polymerace gelů byly připraveny vzorky na SDS-PAGE podle následujícího postupu:

- Naředění vzorků vzorkovým pufrům (125 mM Tris; 20% glycerol; 0,001% BPB; 4% SDS a 50 mM DTT; pH 6,8) tak, aby bylo docíleno empiricky ověřené nanášky pro daný protein.
- Důkladné promíchání vzorků.
- Vaření vzorků při teplotě 100 °C po dobu 3 minut.
- Centrifugace vzorků: 30 s, 8 000 g.

Vlastní SDS-PAGE byla provedena v následujících krocích:

- Sestavení aparatury na elektroforézu a nalití elektrodového pufru (25 mM Tris; 192 mM glycín a 3,5 mM SDS).
- Nanášení standardu molekulových hmotností, vzorků a pozitivních kontrol (viz tabulka 3) nanášecí pipetou v dané koncentraci (maximálně 15 μl na jamku).
- Připojení zdroje stejnosměrného napětí a nastavení parametrů:
 - Proud: viz tabulka 3, přičemž prvních 10 minut nastavena poloviční hodnota proudu
 - Napětí: 100 V
 - Čas: 45-90 minut v závislosti na molekulové hmotnosti analyzovaného proteinu

- Po skončení elektroforézy vložení gelů přibližně na 5 minut do transferového pufru (25 mM Tris; 192 mM glycin a 20% methanol; pH 8,3).

Tabulka 3: Parametry elektroforézy

Protein	Nanáška (μg proteinu)	Proud (mA/gel)	Pozitivní kontrola
HPRT1	5	30	-
PRX6	10		Mozek
TRX1	70		-
TRX2	15		-
HO1	50		-
HO2	25		Mozek
iPLA ₂	20		-
TRXR1	50	25	Varlata
ACO1	50	20	-
ACO2	3		-

HPRT1 – hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1, PRX6 – peroxiredoxin 6, TRX1 – thioredoxin 1, TRX2 – thioredoxin 2, HO1 – hemoxigenáza 1, HO2 – hemoxigenáza 2, iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂, TRXR1 – thioredoxinreduktáza 1, ACO1 – akonitáza 1, ACO2 – akonitáza 2

4.4.4 Western blot

K přenosu proteinů z gelů na nitrocelulóзовé membrány byla použita metoda Western blot (Towbin et al., 1979) na aparatuře AmershamTM. Pro elektropřenos byl sestaven „sendvič“ obsahující gel, nitrocelulóзовou membránu (Amersham HybondTM-C), papír na blotování (QuickDrawTM) a pěnové polštářky.

- Sestavení „sendvičů“ v pořadí: pěnový polštářek – papír – gel – membrána – papír – pěnový polštářek tak, aby mezi jednotlivými vrstvami nebyly vzduchové bubliny.
- Vložení „sendvičů“ do aparatury na Western blot.
- Nastavení parametrů:
 - Proud: 350 mA
 - Napětí: 100 V
 - Čas: 1 hodina
- Po skončení elektropřenosu vyjmutí membrán z aparatury a jejich vložení do TTBS pufru (solný roztok pufrovaný Tris s Tweenem 20: 0,02 M Tris; 0,5 M NaCl a 0,1% Tween 20; pH 7,5).

4.4.5 Imunodetekce

Imunodetekce proteinů na membráně byla prováděna nepřímo za pomoci primární protilátky a sekundární protilátky konjugované s křenuvou peroxidázou (HRP) dle protokolu firmy Amersham (GE Healthcare) v následujících krocích:

- Blokování 5% mlékem s nízkým obsahem tuku v TTBS pufru (20 ml/membrána): na kývačce při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
- 3x promytí v TTBS pufru po 5 minutách.
- Inkubace membrán s primární protilátkou (viz tabulka 4) v TTBS pufru (10 ml/membrána) na kývačce po dobu:
 - 1,5 hodiny při pokojové teplotě: HPRT1, PRX6, TRX1, TRX2, HO1, HO2, iPLA₂, ACO1 a ACO2
 - Přes noc při teplotě 4 °C: TRXR1
- 3x promytí v TTBS pufru po 5 minutách.
- Následně inkubace membrán se sekundární protilátkou (viz tabulka 4) v TTBS pufru (20 ml/membrána) na kývačce při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
- 3x promytí v TTBS pufru po 5 minutách.
- Membrány ponechány v cca 20 ml TTBS pufru po dobu:
 - Přes noc při teplotě 4 °C: HPRT1, PRX6, TRX1, TRX2, HO1, HO2, iPLA₂, ACO1 a ACO2
 - 3 hodiny na kývačce při pokojové teplotě: TRXR1

Tabulka 4: Přehled používaných primárních a sekundárních protilátek**Primární protilátky**

Název	Výrobce	Katalogové číslo	Typ	Ředění
anti-HPRT1	Abcam	ab10479	Králičí polyklonální protilátka	1:1333
anti-PRX6		ab59543		1:4000
anti-TRX1		ab86255		1:1000
anti-TRX2	Santa-Cruz Biotechnology	sc-50336		1:1000
anti-HO1	Abcam	ab13243		1:2000
anti-HO2		ab90492		1:1000
anti-iPLA ₂	Cayman	160507		1:2000
anti-TRXR1	Cell Signaling	6925		1:1000
anti-TRX1		2429		1:1000
anti-ACO1	Abcam	ab126595	Králičí monoklonální protilátka	1:3333
anti-ACO2		ab129105		1:30000

Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou

Protilátka proti králičím protilátkám	Sigma-Aldrich	a9169	Z kozího antiséra	1:6000
---------------------------------------	---------------	-------	-------------------	--------

HPRT1 – hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1, PRX6 – peroxiredoxin 6, TRX1 – thioredoxin 1, TRX2 – thioredoxin 2, HO1 – hemoxigenáza 1, HO2 – hemoxigenáza 2, iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂, TRXR1 – thioredoxinreduktáza 1, ACO1 – akonitáza 1, ACO2 – akonitáza 2

4.4.6 Metoda zesílené chemiluminiscence

K detekci signálu po imunodetekci byla použita metoda zesílené chemiluminiscence (ECL), která umožňuje detekovat HRP (Thorpe et al., 1985). Emitované světlo má vlnovou délku 428 nm, a je tedy možné ho zachytit na autoradiografický či rentgenový film nebo snímat pomocí speciální kamery Fujifilm LAS 4000 dle následujícího postupu:

- Vyjmutí membrán z TTBS pufru a jejich důkladné okapání.
- Inkubace membrán s připravenými roztoky viz tabulka 5 nebo komerčními vyvolávacími roztoky (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate). V obou případech se roztoky používají v poměru 1:1 po dobu 1 minuty.
- Okapání vyvolávacích roztoků z membrán.
- Vložení membrán do průhledných eurodesek tak, aby mokré membrány nepřišly do styku s filmem a byla usnadněna jakákoliv manipulace s nimi.

- Vyvolání v temné místnosti na autoradiografický film (Medical X-ray film blue, Agfa) nebo pomocí kamery LAS 4000.
- Délka expozice závisí na stanovovaném proteinu (30 sekund až 10 minut).

Tabulka 5: Složení ECL vyvolávacích roztoků

1	0,1 M Tris; pH 8,8 + 0,5 ml 0,25 M luminolu v DMSO + 220 µl 90 mM kyseliny p-kumarové v DMSO
2	5,4 mM H ₂ O ₂ v 0,1 M Tris; pH 8,8

4.4.7 Vyhodnocení relativního množství proteinů a zpracování dat

Vyhodnocení signálu z imunodetekce bylo provedeno dle následujícího postupu:

- V případě vyvolávání na autoradiografický film – naskenování filmů a uložení ve formátu TIFF.
- V případě vyvolávání kamerou LAS 4000 – uložení ve formátu TIFF.
- Následně vyhodnocení v programu ImageQuant™ TL: Intenzity jednotlivých pruhů jsou získané sečtením hodnot všech pixelů zahrnutých do obdélníkového rámečku kolem daného pruhu. Od této hodnoty intenzity je odečtena hodnota pozadí (resp. průměr hodnot pixelů ležících pod obdélníkem ohraničujícím pruh). Výsledkem je bezrozměrná hodnota, tzv. denzitometrický objem.
- Poté vztažení získaných denzitometrických objemů na 1 µg naneseného proteinu a přepočítání na arbitrární jednotky. Ty jsou dány součtem hodnocených denzitometrických objemů, který je roven 100 %. U experimentálních modelů:
 - Efekt IHH: 100 % je součet denzitometrických objemů dvou vyhodnocovaných skupin (kontrola a hypoxie).
 - Vliv tempolu: 100 % je součet denzitometrických objemů čtyř vyhodnocovaných skupin (kontrola bez tempolu, kontrola s tempolem, hypoxie bez tempolu a hypoxie s tempolem).

Pro zpracování dat byly použity následující počítačové programy:

- Výpočty: Microsoft Excel 2010.
- Tvorba grafů: GraphPad Prism 5.
- Statistické vyhodnocení: SigmaStat – analýzy OneWay a TwoWay ANOVA s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a rozptyl dat jako střední chyba průměru (S. E. M.). Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti menší než 0,05 ($p < 0,05$).

4.5 Nepřímá imunofluorescence

Metoda nepřímé imunofluorescence slouží k analýze buněčné lokalizace stanovovaného proteinu, který je nejprve rozeznán specifickou primární protilátkou a ta je následně detekovaná pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky. K určení buněčné lokalizace jsou používány markery buněčných struktur (např. buněčná jádra jsou fluorescenčně značena prostřednictvím DAPI, které se váže na DNA) (Alberts et al., 2002).

K imunofluorescenční detekci byl použit myokard LV potkana adaptovaného na IHH a kontrolního normoxického potkana. K analýzám byly připraveny kryorezy o tloušťce 5 μm na kryomikrotomu Leica CM3050 S. Celý proces barvení probíhá na podložních sklíčkách (Thermo Scientific) v následujících krocích (od blokace sérem jsou podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce):

- Fixace řezů 4% roztokem formaldehydu bez methanolu v PBS pufru po dobu 5 minut.
- 3x promytí PBS pufrem po 3 minutách.
- Blokace nespecifické fluorescence sérem (10% oslí sérum; 10% kozí sérum; 1% BSA; 0,3% Triton X-100 a 0,3 M glycin v PBS pufru) v objemu 100 μl na jamku (tj. skupina kryorezů na podložním sklíčku) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
- 3x promytí PBS pufrem po 3 minutách.
- Inkubace s primární protilátkou (viz tabulka 6) v PBS pufru s 1% BSA v objemu 100 μl na jamku přes noc v 4 °C.
- 3x promytí PBS pufrem po 3 minutách.
- Inkubace se sekundární protilátkou (viz tabulka 6) v PBS pufru s 1% BSA v objemu 100 μl na jamku po dobu 45 minut při pokojové teplotě.
- 3x promytí PBS pufrem po 3 minutách.

Tabulka 6: Přehled používaných protilátek pro imunofluorescenční značení

Primární protilátka

Název	Výrobce	Katalogové číslo	Typ	Ředění
Anti-thioredoxin 1	Abcam	ab86255	Králičí polyklonální protilátka	1:200

Sekundární protilátka

Anti-rabbit IgG konjugovaný s Alexa Fluor® 488	Life technologies	A-21206	Z oslího antiséra	1:200
--	-------------------	---------	-------------------	-------

- Příprava trvalého preparátu:
 - Nanesení malého množství ProLong® Gold Antifade Reagent s DAPI na podložní sklíčko do oblasti kryorezů.
 - Přiložení krycího sklíčka a odstranění bublinek mezi sklíčky.
 - Zalakování okrajů pro vytvoření trvalého preparátu.

4.5.1 Vyhodnocení nepřímé imunofluorescence a zpracování dat

Trvalé preparáty po imunofluorescenčním značení byly snímány wide-field epifluorescenčním mikroskopem OlympusCell^R IX2-UCB, který využívá bílé světlo ze rtuťové výbojky. Bylo použito následující příslušenství mikroskopu:

- Objektiv: 1,35 NA Plan-Apochromat
- Fluorescenční kostky:
 - U-MVIBA3 477/530 (Olympus) pro detekci signálu Alexa Fluor® 488
 - DAFITR 350/457 (Chroma technology corporation) pro detekci signálu DAPI
- Kamera: Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG

Snímky byly uloženy ve formátu 16-bit TIFF a následně upraveny programem FIJI (Schindelin et al., 2012) v těchto krocích:

- Odečtení pozadí pomocí nastavení hraniční intenzity signálu (rolling ball 25).
- Následovala tzv. pseudokolorace snímku, tzn. převod snímku ze stupňů šedi do barevného RGB formátu.
- Kalibrace podle použitého zvětšení (60 x).
- Uspořádání snímků do tabulky.

5 Výsledky

5.1 Hmotnostní parametry

Tabulka 7 ukazuje vliv adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH) na hmotnostní parametry pokusných potkanů. Po adaptaci na IHH se mírně snížila hmotnost těla (BW; o 7 %) u hypoxické skupiny ve srovnání s kontrolami. Signifikantně se zvýšila celková hmotnost srdce (HW; o 27 %) u zvířat hypoxické skupiny, což bylo způsobeno především hypertrofií pravé komory (RVW; o 58 %), ale i levé komory (LVW; o 23 %) a mírně se zvýšila i hmotnost septa (SW; o 11 %) ve srovnání s kontrolními potkany.

Relativní hmotnost srdce (HW/BW) se po adaptaci na IHH zvýšila o 37 % oproti kontrole. Současně se zvýšila relativní hmotnost pravé komory (RVW/BW; o 71 %), relativní hmotnost levé komory (LVW/BW; o 32 %) i relativní hmotnost septa (SW/BW; o 20 %). Poměr hmotností RVW/LVW byl o 30 % vyšší u skupiny adaptované na IHH než u kontrolních zvířat.

Tabulka 7: Hmotnostní parametry kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH

Parametry	Kontrola	Hypoxie
n	6	6
BW [g]	397 ± 13	371 ± 10
HW [mg]	907 ± 37	1155 ± 48 *
RVW [mg]	189 ± 10	299 ± 10 *
LVW [mg]	500 ± 16	613 ± 32 *
SW [mg]	219 ± 11	244 ± 9
HW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	2,28 ± 0,07	3,14 ± 0,19 *
RVW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,47 ± 0,02	0,81 ± 0,04 *
LVW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	1,26 ± 0,04	1,67 ± 0,12 *
SW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,55 ± 0,02	0,66 ± 0,03 *
RVW/LVW	0,38 ± 0,01	0,49 ± 0,02 *

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S. E. M.; n – počet zvířat ve skupině, BW – hmotnost těla, HW – hmotnost srdce, RVW – hmotnost pravé komory, LVW – hmotnost levé komory, SW – hmotnost septa, HW/BW – relativní hmotnost srdce, RVW/BW – relativní hmotnost pravé komory, LVW/BW – relativní hmotnost levé komory, SW/BW – relativní hmotnost septa. RVW/LVW – relativní poměr hmotnosti pravé a levé komory. * statisticky významný rozdíl hypoxie vs. kontrola ($p < 0,05$).

5.2 Koncentrace proteinů v homogenátu

K analýzám efektu IHH na relativní zastoupení proteinů v srdeční tkáni byl použit myokard levé komory (LV). V tabulce 8 jsou uvedeny celkové koncentrace proteinů v homogenátu kontrolní a hypoxické tkáně, mezi nimiž nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl.

Tabulka 8: Koncentrace proteinů v homogenátu z kontrolního a hypoxického myokardu levé komory potkana

Kontrola (µg/µl)	Hypoxie (µg/µl)
28,04 ± 1,00	27,43 ± 0,78

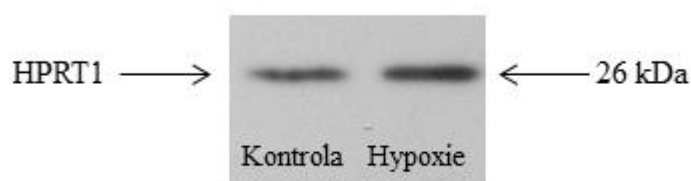
Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr koncentrací proteinů ze šesti nezávislých měření ± S. E. M.

5.3 Testování hypoxantinguaninfosforibosyltransferázy 1 jako housekeeping proteinu pro model intermitentní hypobarické hypoxie

Ve snaze najít vhodný housekeeping protein pro IHH model byl testován protein hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1 (HPRT1), protože je použit jako referenční gen pro stanovení efektu IHH na expresi antioxidantních enzymů metodou RT-PCR. K analýze byl použit homogenát z myokardu LV potkanů adaptovaných na IHH a kontrolních normoxických potkanů.

HPRT1 byl identifikován pomocí srovnání elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech. Signál HPRT1 byl detekován jako pruh o molekulové hmotnosti 26 kDa (viz obrázek 9).

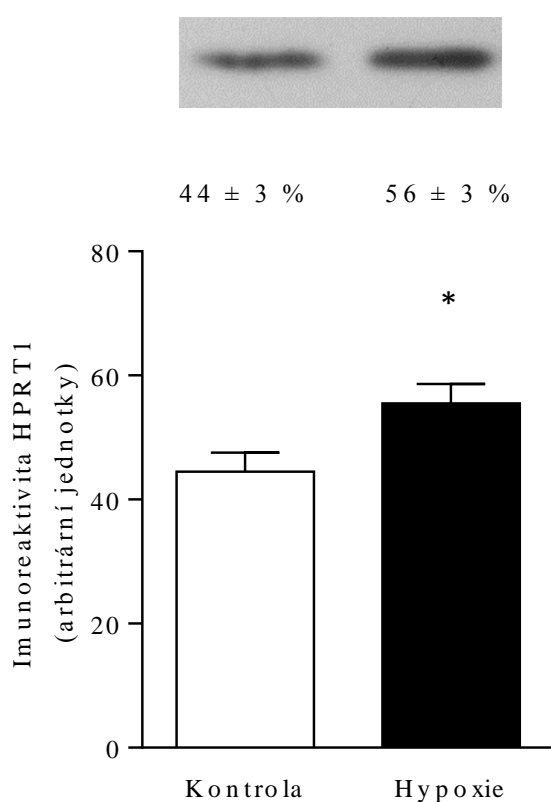
Obrázek 9: Identifikace HPRT1



Film s ECL signálem, expozice 6 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající hypoxantinguaninfosforibosyltransferáze 1 (HPRT1). Nanáška 5 µg proteinu.

Po adaptaci na IHH byl pozorován statisticky významný nárůst (o 25 %) relativního množství HPRT1 ve srovnání s kontrolou (viz graf 1). Z toho vyplývá, že HPRT1 není vhodným housekeeping proteinem pro model IHH. Proto byl při analýzách relativního množství antioxidantních enzymů, enzymů metabolismu železa a relativního množství na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ použit celkový protein jako nejvhodnější referenční hodnota, protože se po adaptaci na IHH nemění.

Graf 1: Relativní množství HPRT1 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení hypoxantinguaninfosforibosyltransferázy 1 (HPRT1). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot. * statisticky významný rozdíl hypoxie vs. kontrola (p < 0,05).

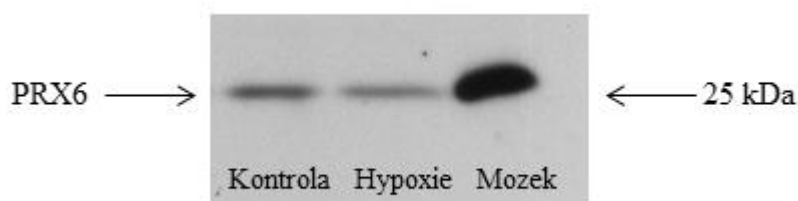
5.4 Relativní množství antioxidantních enzymů po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

Po adaptaci na IHH byly stanoveny změny v relativním zastoupení následujících antioxidantních enzymů: peroxiredoxin 6 (PRX6), thioredoxin 1 (TRX1), thioredoxin 2 (TRX2) a thioredoxinreduktáza 1 (TRXR1).

5.4.1 Identifikace antioxidantních enzymů

PRX6 byl identifikován pomocí pozitivní kontroly (homogenát mozku potkana) a srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů standardů molekulových hmotností. Signál PRX6 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 25 kDa (viz obrázek 10).

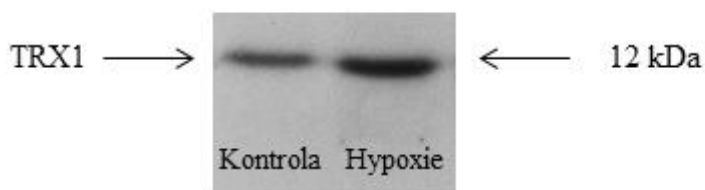
Obrázek 10: Identifikace PRX6



Film s ECL signálem, expozice 10 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající peroxiredoxinu 6 (PRX6). Nanáška 10 µg proteinu.

Pro identifikaci TRX1 bylo použito srovnání elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů standardů o známých molekulových hmotnostech. TRX1 byl stanoven jako pruh o molekulové hmotnosti 12 kDa (viz obrázek 11).

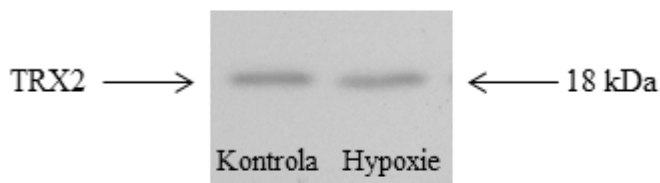
Obrázek 11: Identifikace TRX1



Film s ECL signálem, expozice 10 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající thioredoxinu 1 (TRX1). Nanáška 70 µg proteinu.

Specifická ECL signál TRX2 proteinu byla ověřena srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů standardů o známých molekulových hmotnostech. Signál TRX2 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 18 kDa (viz obrázek 12).

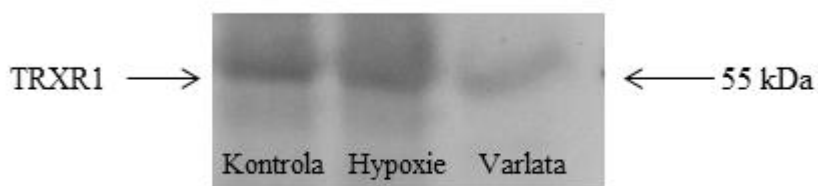
Obrázek 12: Identifikace TRX2



Film s ECL signálem, expozice 10 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající thioredoxinu 2 (TRX2). Nanáška 15 µg proteinu.

TRXR1 byla identifikována pomocí pozitivní kontroly (homogenát varlat potkana) a srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů standardů molekulových hmotností, přičemž TRXR1 byla stanovena jako pruh o molekulové hmotnosti 55 kDa (viz obrázek 13).

Obrázek 13: Identifikace TRXR1

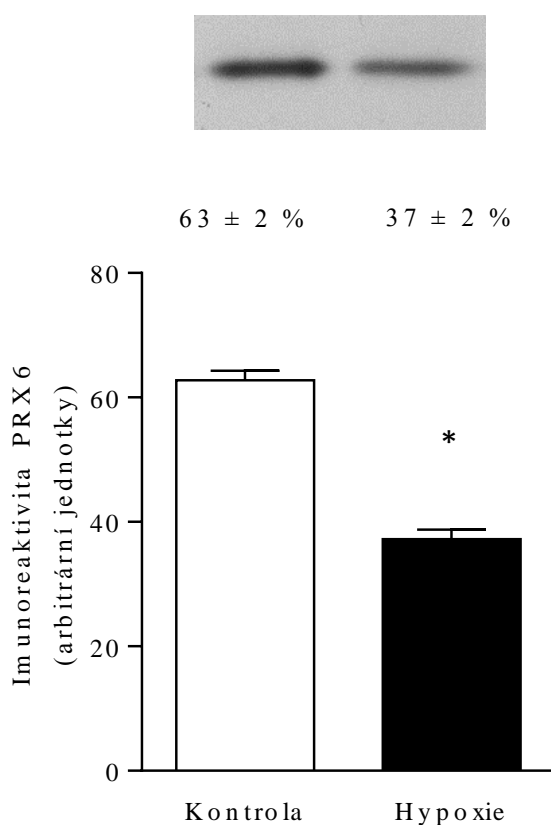


Film s ECL signálem, expozice 10 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající thioredoxinreduktáze 1 (TRXR1). Nanáška 50 µg proteinu.

5.4.2 Relativní zastoupení antioxidačních enzymů

Graf 2 ukazuje relativní zastoupení PRX6 v homogenátu z kontrolního a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu LV potkana. Lze pozorovat, že adaptace na IHH snížila relativní množství PRX6 o 41 % ve srovnání s kontrolními potkany.

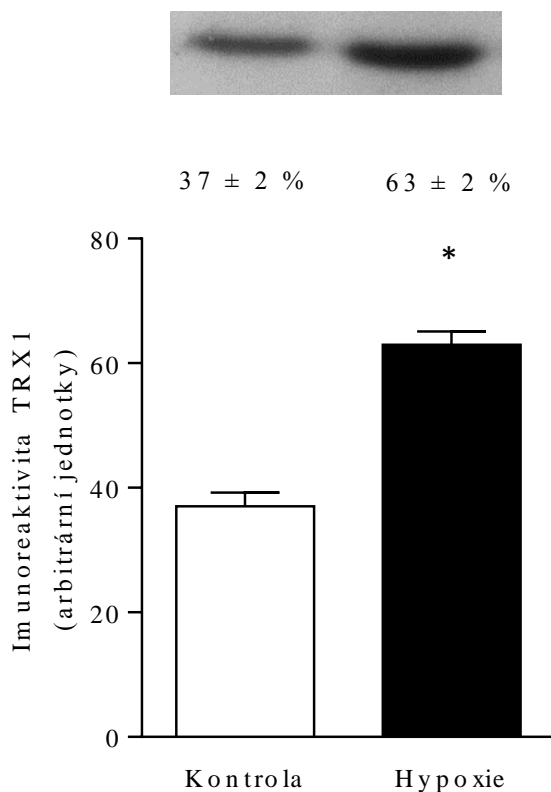
Graf 2: Relativní množství PRX6 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; $n = 6$. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení peroxiredoxinu 6 (PRX6). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu \pm S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.
* statisticky významný rozdíl hypoxie vs. kontrola ($p < 0,05$).

Dále bylo analyzováno relativní množství TRX1 v homogenátu z kontrolního a na IHH adaptovaného myokardu LV potkana. Výsledky ukazují, že se množství TRX1 po adaptaci na IHH signifikantně zvýšilo (o 70 %) v porovnání s kontrolami (viz graf 3).

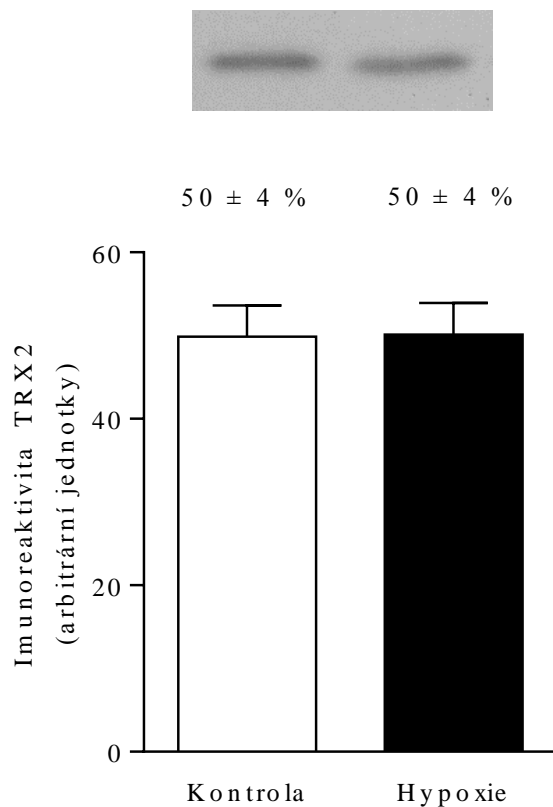
Graf 3: Relativní množství TRX1 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení thioredoxinu 1 (TRX1). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot. * statisticky významný rozdíl hypoxie vs. kontrola ($p < 0,05$).

Graf 4 demonstruje stanovené relativní množství TRX2 v homogenátu z kontrolního a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu LV potkana. Po adaptaci na IHH nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v množství TRX2.

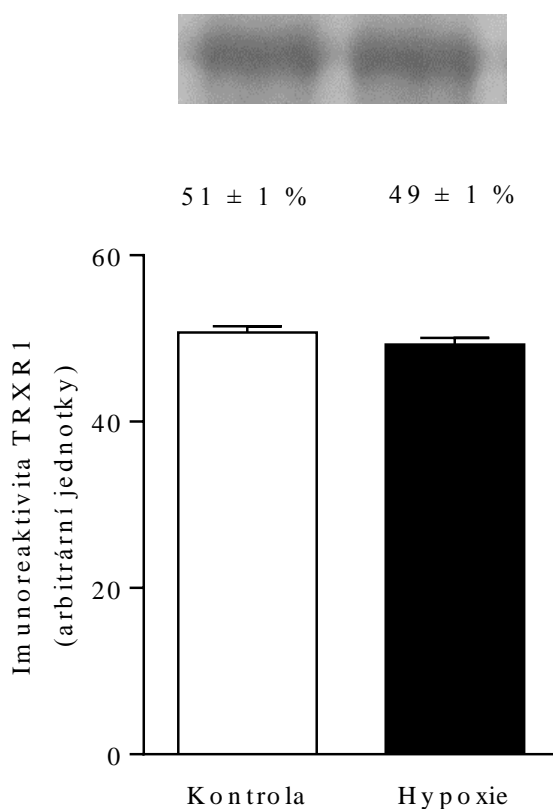
Graf 4: Relativní množství TRX2 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení thioredoxinu 2 (TRX2). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.

Bylo stanoveno relativní množství TRXR1 v homogenátu z myokardu LV kontrolních normoxických potkanů a na chronickou hypoxii adaptovaných potkanů, které prezentuje graf 5. Z výsledků vyplývá, že adaptace na IHH nemá statisticky významný vliv na zastoupení TRXR1 v srdečním svalu.

Graf 5: Relativní množství TRXR1 u kontrolních a na IHH adaptovaných potkanů

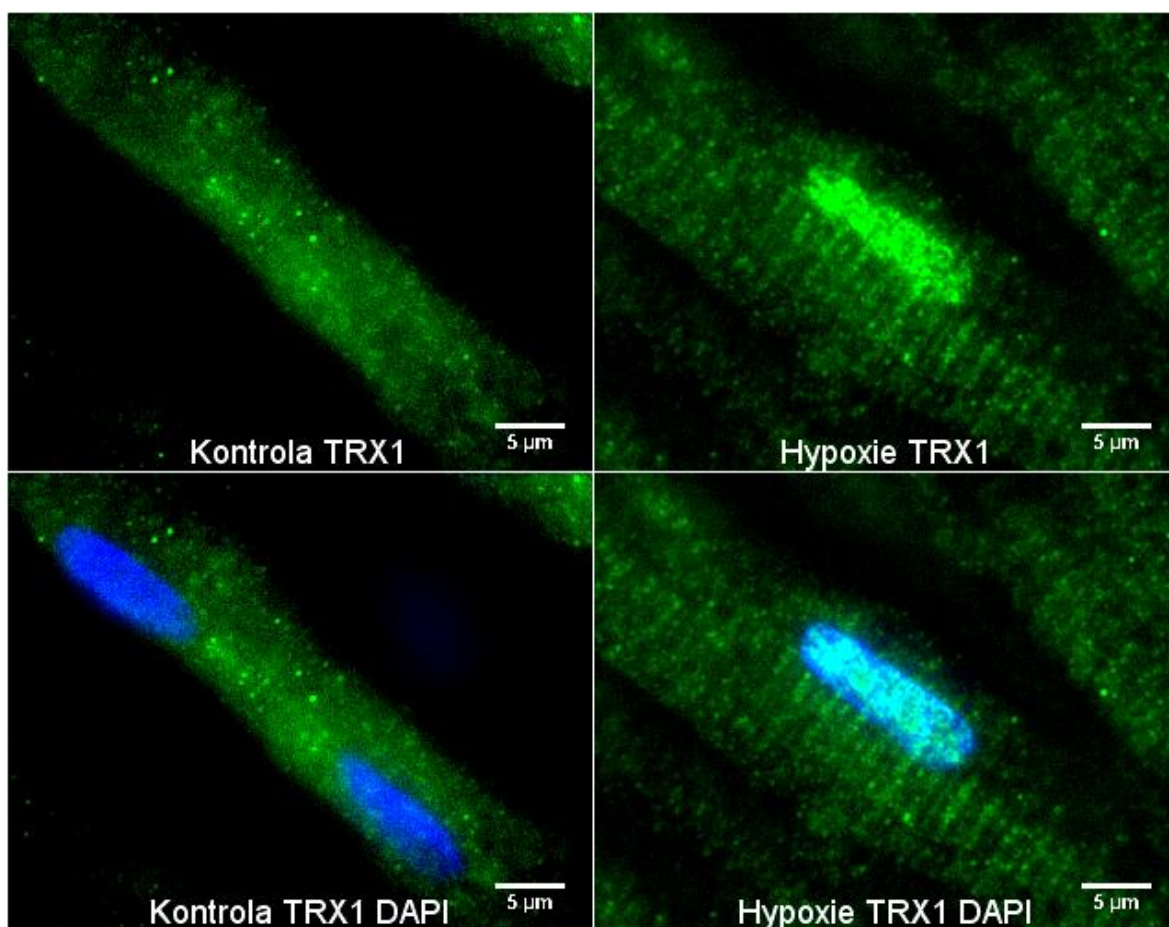


Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení thioredoxinreduktázy 1 (TRXR1). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S.E.M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.

5.5 Imunofluorescenční lokalizace thioředoxinu 1 po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

Pilotní imunofluorescenční analýzy ukazují, že v kardiomyocytech z myokardu LV potkana dochází po adaptaci na IHH k translokaci TRX1 z cytosolu do jádra. Oproti tomu v kardiomyocytech normoxické kontroly je TRX1 lokalizovaný pouze v cytosolu (viz obrázek 14).

Obrázek 14: Lokalizace TRX1 v kardiomyocytech u kontrolních a na IHH adaptovaných potkanů



Reprezentativní snímky z wide-field epifluorescenčního mikroskopu prezentují lokalizaci thioředoxinu 1 (TRX1) v kardiomyocytech z myokardu levé komory při zvětšení 60 x. Zelená barva znázorňuje signál TRX1 detekovaný prostřednictvím sekundární protilátky konjugované s Alexa Fluor® 488. Modře jsou značena jádra díky použití fluorescenční barvy DAPI. Pro stanovení byla použita dvě srdce potkanů adaptovaných na IHH a dvě normoxická kontrolní srdce.

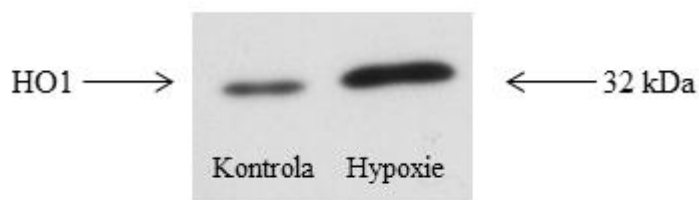
5.6 Relativní množství enzymů metabolismu železa po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

Dále byly po adaptaci na IHH stanoveny změny v relativním zastoupení těchto enzymů metabolismu železa: hemoxygenáza 1 (HO1), hemoxygenáza 2 (HO2), akonitáza 1 (ACO1) a akonitáza 2 (ACO2).

5.6.1 Identifikace enzymů metabolismu železa

HO1 byla identifikována pomocí srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou standardů molekulových hmotností. HO1 byla stanovena jako pruh o molekulové hmotnosti 32 kDa (viz obrázek 15).

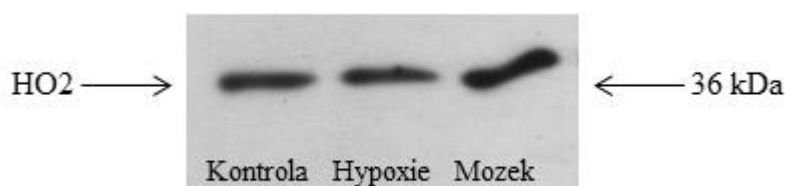
Obrázek 15: Identifikace HO1



Film s ECL signálem, expozice 10 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající hemoxygenáze 1 (HO1). Nanáška 50 µg proteinu.

HO2 byla stanovena pomocí pozitivní kontroly (homogenát mozku potkana) a srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů standardů molekulových hmotností. HO2 byla identifikována jako pruh o molekulové hmotnosti 36 kDa (viz obrázek 16).

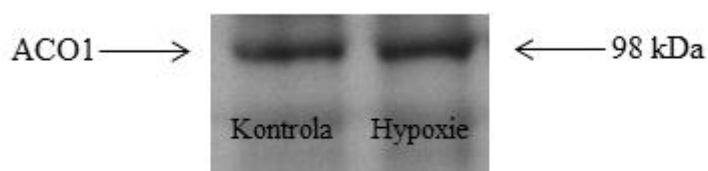
Obrázek 16: Identifikace HO2



Film s ECL signálem, expozice 5 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající hemoxygenáze 2 (HO2). Nanáška 25 µg proteinu.

Pro identifikaci ACO1 bylo použito srovnání elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou standardů molekulových hmotností. Signál z ACO1 byl detekován jako pruh o molekulové hmotnosti 98 kDa (viz obrázek 17).

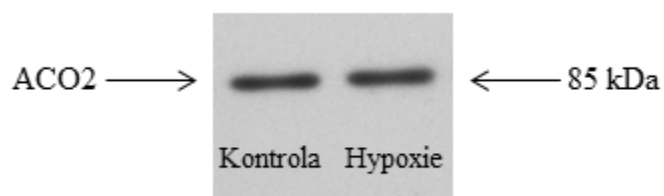
Obrázek 17: Identifikace ACO1



Film s ECL signálem, expozice 5 minut. Šipkou je označen pruh odpovídající akonitáze 1 (ACO1). Nanáška 50 μ g proteinu.

Specifická ECL signálu ACO2 byla ověřena srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi dvou druhů proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech. ACO2 byla identifikována jako pruh o molekulové hmotnosti 85 kDa (viz obrázek 18).

Obrázek 18: Identifikace ACO2

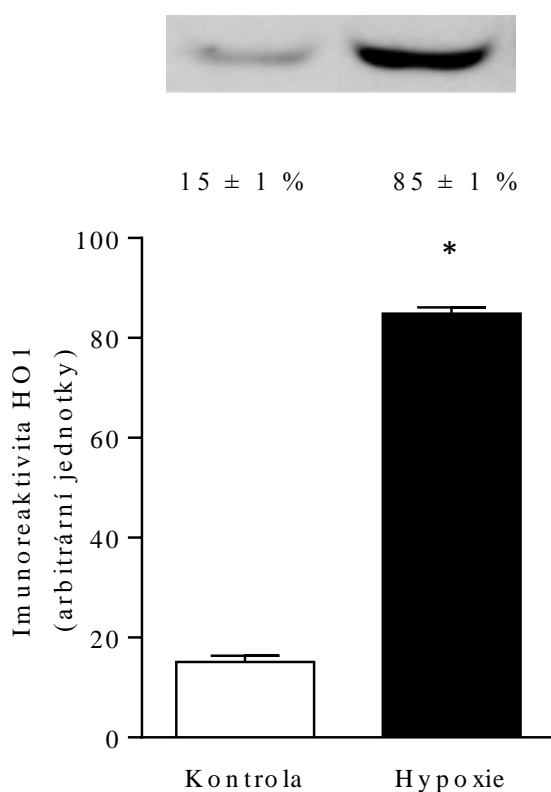


Film s ECL signálem, expozice 30 sekund. Šipkou je označen pruh odpovídající akonitáze 2 (ACO2). Nanáška 3 μ g proteinu.

5.6.2 Relativní zastoupení enzymů metabolismu železa

Graf 6 prezentuje relativní množství HO1 v homogenátu z myokardu LV potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii a kontrolních potkanů. Adaptace na IHH signifikantně zvýšila množství HO1 (o 462 %) v porovnání s kontrolou.

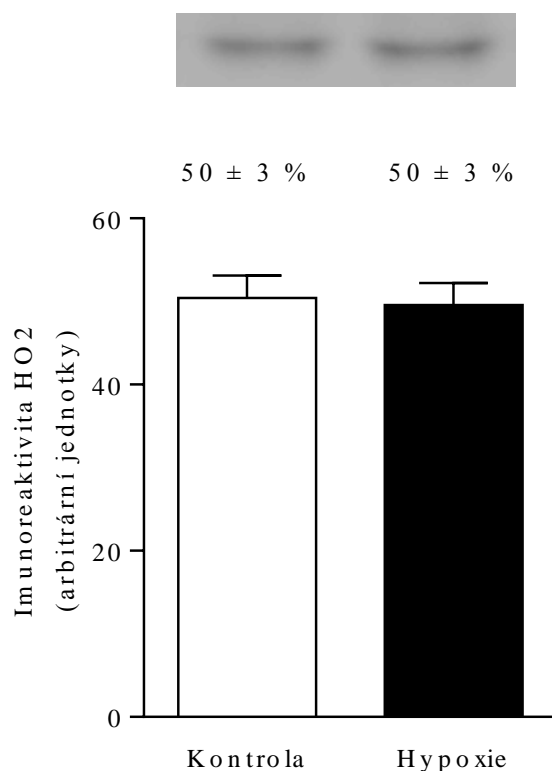
Graf 6: Relativní množství HO1 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; $n = 6$. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení hemoxigenázy 1 (HO1). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu \pm S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot. * statisticky významný rozdíl hypoxie vs. kontrola ($p < 0,05$).

Relativní zastoupení HO2 v homogenátu z myokardu LV kontrolních normoxických potkanů a na chronickou hypoxii adaptovaných potkanů ukazuje graf 7. Z výsledků vyplývá, že adaptace na IHH nemá vliv na množství HO2 v myokardu.

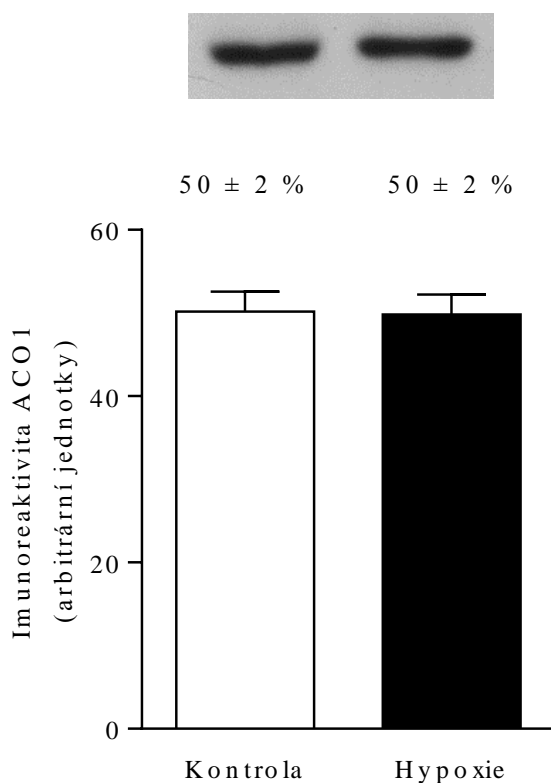
Graf 7: Relativní množství HO2 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení hemoxigenázy 2 (HO2). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.

Stanovené množství ACO1 v homogenátu z normoxického a na IHH adaptovaného myokardu LV potkana je prezentováno v grafu 8. Z výsledků vyplývá, že adaptace na IHH nemá vliv na zastoupení ACO1 v srdečním svalu.

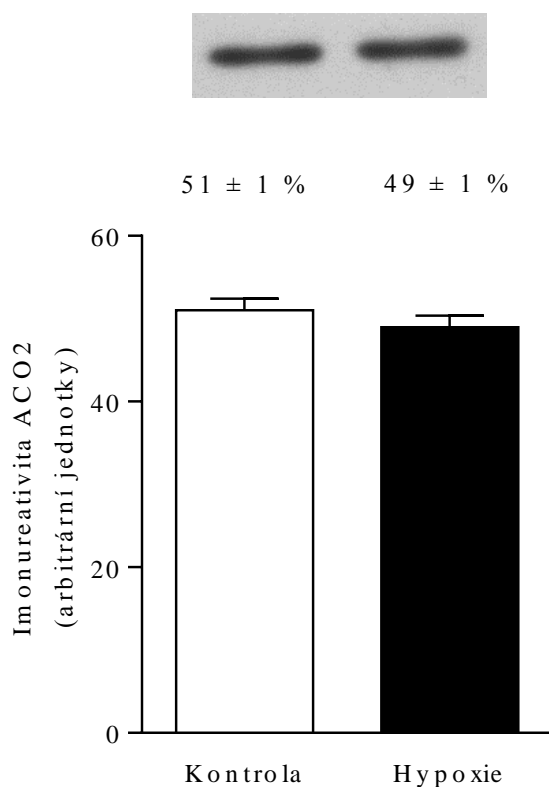
Graf 8: Relativní množství ACO1 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení akonitázy 1 (ACO1). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.

Graf 9 demonstruje relativní množství ACO2 v homogenátu z kontrolního a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu LV potkana. Po adaptaci na IHH nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v množství ACO2.

Graf 9: Relativní množství ACO2 u kontrolních potkanů a potkanů adaptovaných na IHH



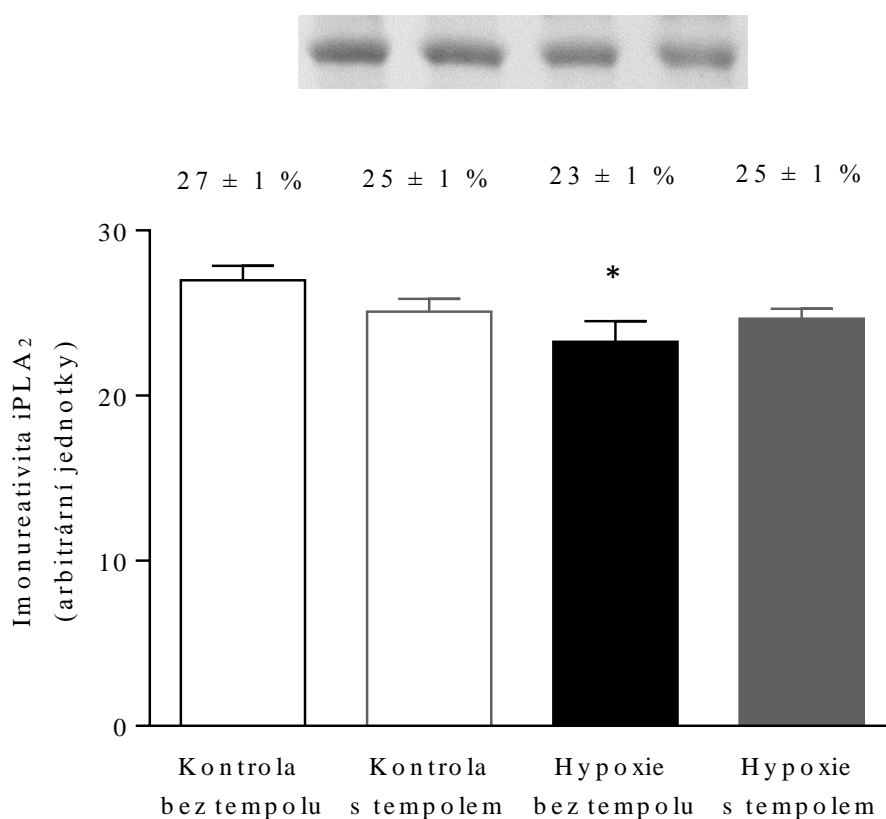
Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení akonitázy 2 (ACO2). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů dvou experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot.

5.7 Vliv tempolu na relativní zastoupení na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

Analyzovaná množství proteinu na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ (iPLA₂) v homogenátu z kontrolního a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu LV potkana jsou prezentovány v grafu 10.

V tomto experimentu jsme potvrdili pokles v relativním zastoupení iPLA₂ po adaptaci na IHH ve srovnání s kontrolními zvířaty (o 14 %). Podávání antioxidantu tempolu nepatrně snížilo množství iPLA₂ u kontrolních zvířat. Tento efekt zabránil návratu relativního množství iPLA₂ po adaptaci na IHH na původní hodnoty kontrolních zvířat bez tempolu.

Graf 10: Relativní množství iPLA₂ u kontrolních a na IHH adaptovaných potkanů: vliv antioxidantu tempolu



Graf znázorňuje aritmetický průměr, chybové úsečky odpovídají S. E. M.; n = 6. Arbitrární jednotky označují procentuální zastoupení na kalcium nezávislé fosfolipázy A₂ (iPLA₂). Za 100 % byl považován součet denzitometrických objemů čtyř experimentálních skupin. Nad grafem je uveden průměr relativního množství proteinu ± S. E. M. v procentech u jednotlivých experimentálních skupin. Součástí je reprezentativní Western blot. * statisticky významný rozdíl hypoxie bez tempolu vs. kontrola bez tempolu (p < 0,05).

6 Diskuze

6.1 Hmotnostní parametry

Adaptace potkanů na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH) odpovídající nadmořské výšce 7 000 m vedla k nesignifikantnímu snížení hmotnosti těla pokusných zvířat nejspíše v důsledku stresu, kterému byla vystavena. Dále adaptace na IHH vyvolala zvýšení celkové hmotnosti srdce, které bylo způsobeno především hypertrofií pravé komory. Současně se po adaptaci na IHH zvýšil relativní poměr hmotnosti srdce vůči hmotnosti těla a relativní poměr hmotností obou komor i septa. Tyto výsledky jsou v souladu s pracemi, které se zabývají adaptací na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce (Balková et al., 2011; Kolář et al., 2007; Neckář et al., 2005). V průběhu adaptace na IHH totiž dochází k tlakovému přetížení a rozvoji plicní hypertenze, která má vliv na hmotnost a funkci především pravé komory srdeční a vede k její hypertrofii. K mírné hypertrofii levé komory (LV) dochází nejspíše z důvodu zvýšené objemové zátěže během hypoxie a svou roli může hrát i zvýšená viskozita krve (Ošťádal & Kolář, 2007).

6.2 Hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1 jako housekeeping protein

Ve snaze najít pro model IHH vhodný housekeeping protein, jehož relativní zastoupení by se po adaptaci na tento model chronické hypoxie neměnilo, byl testován protein HPRT1, který byl zvolen, protože je používán jako referenční gen pro stanovení efektu IHH metodou RT-PCR (Waskova-Arnoštová et al., 2013). Důvodem bylo zachování stejných podmínek pro stanovení relativního množství enzymů jak metodou Western blot, tak metodou RT-PCR.

Obecně je pro tento model chronické hypoxie obtížné nalézt housekeeping protein pro metodu Western blot. Adaptace na nadmořskou výšku 7 000 m je totiž pro modelové organismy natolik zatěžující, že u nich obvykle dochází ke změnám relativního množství řady proteinů. V minulosti byly v naší laboratoři testovány běžně používané housekeeping proteiny – aktin, β -tubulin, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza a kalsequestrin. Jejich relativní zastoupení se ale po adaptaci na IHH zvýšilo (Balková et al., 2011).

Zavedli jsme proto stanovení množství HPRT1 v homogenátu myokardu LV, abychom zjistili, zda bude vhodným housekeeping proteinem pro model IHH. Pro stanovení HPRT1 byla použita komerčně dostupná protilátka od firmy Abcam, která je hojně používána i v dalších pracích (O'Bryan et al., 2013; Plant et al., 2009). Výhodou

ECL signálu HPRT1 je to, že se v jeho okolí nevyskytuje žádný nespecifický signál jiného proteinu. Stejně jako v ostatních studiích jsme detekovali HPRT1 jako pruh o molekulové hmotnosti 26 kDa (O'Bryan et al., 2013; Plant et al., 2009).

Zjistili jsme, že se množství HPRT1 na úrovni proteinu po adaptaci na IHH ve srovnání s kontrolními zvířaty zvyšuje. Z čehož plyne, že HPRT1 není vhodným housekeeping proteinem pro metodu Western blot. Ostatní laboratoře zabývající se vlivem chronické hypoxie ve vysoké nadmořské výšce na kosterní svalovinu (Magalhães et al., 2004) a srdeční tkáň (Magalhães et al., 2014; Wang et al., 2011) také nepoužívají žádný referenční protein, na nějž by vztahovaly množství sledovaných proteinů. Proto jsme podobně jako dříve vztahovali výsledky adaptace na IHH u jednotlivých stanovených enzymů na celkové množství proteinu (Balková et al., 2011; Neckář et al., 2005).

6.3 Antioxidační enzymy v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

6.3.1 Imunodetekce antioxidačních enzymů

V naší laboratoři bylo již dříve zavedeno stanovení některých antioxidačních enzymů – superoxiddismutáz (MnSOD, Cu/ZnSOD), katalázy (CAT), některých zástupců peroxiredoxinů (PRX3, PRX5) a glutathionperoxidáz (GPX4). Zavedli jsme proto stanovení i dalších antioxidačních enzymů – peroxiredoxinu 6 (PRX6), thioredoxinů 1 a 2 (TRX1 a TRX2) a thioredoxinreduktázy 1 (TRXR1).

Stanovení analyzovaných antioxidačních enzymů bylo provedeno pomocí komerčních primárních protilátek, které jsou běžně používány i v ostatních studiích. V případě PRX6 (Chiao et al., 2010; Lomnytska et al., 2012) a TRX1 (Harden et al., 2012; Yu et al., 2013) byly použity primární protilátky od firmy Abcam. Navíc imunodetekce TRX1 byla ještě ověřena použitím jiné komerční protilátky od firmy Cell Signaling, která je v publikacích také běžně používána (Calvert et al., 2009). Pro identifikaci TRXR1 byla použita primární protilátka taktéž od firmy Cell Signaling (Yoo et al., 2010). Signál TRX2 byl detekován pomocí primární protilátky od firmy Santa-Cruz Biotechnology (McCommis et al., 2011; Myers et al., 2011).

Specifitu ECL signálu všech sledovaných antioxidačních enzymů jsme ověřili srovnáním s pozicemi dvou různých barevných proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech. Navíc pro správnou identifikaci PRX6 a TRXR1 byly použity pozitivní kontroly. V případě PRX6 jde o extrakt homogenátu mozku, protože se tento enzym hojně vyskytuje v mozkové tkáni (Dammeyer & Arnér, 2011; Fisher, 2011). Pozice

TRXR1 byla ověřena použitím homogenátu varlat, kde je tento enzym ve velké míře zastoupen (Dammeyer & Arnér, 2011). Výhodou je, že se v okolí ECL signálů stanovovaných antioxidačních enzymů nevyskytují žádné nespecifické signály jiných proteinů.

Podobně jako v jiných studiích jsme detekovali PRX6 jako pruh o molekulové hmotnosti 25 kDa (Chiao et al., 2010; Fatma et al., 2011; Lomnytska et al., 2012), signál TRX1 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 12 kDa (Calvert et al., 2009; Im et al., 2012), TRX2 jako pruh o molekulové hmotnosti 18 kDa (Dammeyer & Arnér, 2011; Maulik & Das, 2008) a signál TRXR1 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 55 kDa (Cadenas et al., 2010; Myers et al., 2011).

6.3.2 Relativní množství antioxidačních enzymů

V diplomové práci jsme sledovali změny v relativním zastoupení antioxidačních enzymů (PRX6, TRX1, TRX2 a TRXR1) v homogenátech z myokardu LV potkana adaptovaného na IHH v porovnání s normoxickými kontrolami. Zjistili jsme, že po adaptaci na tento model dochází k poklesu relativního zastoupení PRX6 a naopak růstu TRX1. Relativní množství TRX2 a TRXR1 se po adaptaci na IHH nezměnila.

Jak bylo řečeno v úvodu, adaptace na IHH dlouhodobě zvyšuje odolnost myokardu vůči ischemicko/reperfúznímu (I/R) poškození, což bylo potvrzeno nižším rozsahem infarktového ložiska (Neckář et al., 2002), snížením kontraktilní dysfunkce (Tajima et al., 1994) a nižší mírou arytmogeneze (Asemu et al., 2000). Výsledky naší laboratoře ukázaly, že v aktivaci protektivních signálních kaskád hrají důležitou roli mj. reaktivní formy kyslíku (ROS) (Kolář et al., 2007). Během adaptace na IHH se totiž střídají hypoxické epizody s epizodami reoxygenace, přičemž dochází ke zvýšení oxidačního stresu. To bylo prokázáno sníženým poměrem GSH/GSSG a zvýšeným množstvím lipofuscinu, který vzniká peroxidací nenasycených mastných kyselin (FA) v lipidech. Kromě toho pokusy s N-acetylcysteinem (NAC) ukázaly, že podání tohoto antioxidantu pokusným zvířatům během adaptace na IHH zrušilo protektivní efekt vyvolaný adaptací (Kolář et al., 2007).

Proto jsme se zaměřili na studium vlivu adaptace na IHH na expresi některých antioxidačních enzymů. Stanovili jsme snížené množství proteinu PRX6, který se vyskytuje především v cytosolu. To je v souladu s našimi výsledky dříve analyzovaných PRX, které se vyskytují převážně v mitochondriích – PRX3 a PRX5, a podobně i u dalších antioxidačních enzymů – Cu/ZnSOD a GPX4 docházelo k poklesu (nepublikovaná data). Snížení PRX6 je poněkud kontroverzní výsledek, protože řada výzkumů dokazuje, že

exprese PRX6 by měla být aktivována oxidačním stresem (Kim et al., 2003; Lee et al., 2007). Navíc Nagy et al. zjistili, že delece genu pro PRX6 u myši vedla ke zvýšení velikosti infarktu myokardu a rozvoji apoptózy (Nagy et al., 2006). Jiná studie s pacienty po transplantaci srdce ukázala, že jejich LV obsahovaly nižší koncentrace PRX3, PRX4, PRX5 a PRX6 v porovnání se zdravými jedinci (Brixius et al., 2007). Na druhou stranu pozorovaný pokles antioxidačních enzymů po IHH by mohl přispět ke zvýšení hladiny ROS.

Dalším stanoveným antioxidačním enzymem byl TRX1, jehož množství se po IHH podstatně zvýšilo. K obdobným výsledkům došli i Park a Suzuki, kteří zjistili, že množství TRX1 po adaptaci na intermitentní normobarickou hypoxii (2 minuty 6% O₂/2 minuty 21% O₂; 8 hodin denně) v myším myokardu roste jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu (Park & Suzuki, 2007).

Obecně je funkce TRX1 závislá na jeho redoxním stavu, protože pouze redukovaná forma TRX1 je enzymaticky aktivní (Arnér & Holmgren, 2000). Dá se tedy říci, že TRX1 může sloužit jako senzor oxidačního stresu. Za fyziologických podmínek nebo při mírném oxidačním stresu totiž v buňce převládá redukovaná forma TRX1 (Watson et al., 2008), která působí nejen antioxidačně, ale také antiapoptoticky, protože TRX1 inhibuje proapoptotickou kinázu ASK1 (Saitoh et al., 1998) a nejspíše také nepřímě aktivuje expresi antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Andoh et al., 2002). Na druhou stranu při vysoké míře oxidačního stresu v buňce převládne nefunkční oxidovaná forma TRX1, což vede k dalšímu zvyšování oxidačního stresu, a tedy i iniciaci apoptotické kaskády (Saitoh et al., 1998).

Zdá se tedy, že nárůst relativního množství TRX1 po adaptaci na IHH je způsoben pouze zvýšenou, nikoliv vysokou mírou oxidačního stresu, která vede k aktivaci exprese TRX1, ale nezpůsobuje jeho oxidaci. Zvýšená exprese TRX1 nejspíše souvisí s tím, že promotor genu pro TRX1 obsahuje element citlivý na antioxidanty (ARE), který je rozeznáván transkripčním faktorem Nrf2. Za fyziologických podmínek je Nrf2 inaktivován vazbou represoru, díky čemuž tento transkripční faktor zůstává v cytoplazmě. Při oxidačním stresu je ale tato vazba narušena oxidací Cys zbytků ve struktuře represoru a Nrf2 se může translokovat do jádra, kde se váže na ARE mj. v genu pro TRX1, čímž dochází k nárůstu exprese TRX1 (Calvert et al., 2009; Im et al., 2012). Navíc fosforylace Nrf2 prostřednictvím proteinkinázy C (PKC) také přispívá k translokaci Nrf2 do jádra (Huang et al., 2000). Z výzkumů vyplývá, že PKC hraje významnou roli v kardioprotektivních drahách aktivovaných IHH (Hlaváčková et al., 2010; Neckář et al.,

2005), takže by mohla přispívat ke zvýšení množství TRX1 i v modelu IHH. Dále TRX1 v jádru zvyšuje DNA vazebnou aktivitu transkripčního faktoru Nrf2, a pozitivní zpětnou vazbou tak podporuje protektivní signalizaci (Hansen et al., 2004).

Kvůli zvýšení na úrovni proteinu oproti ostatním analyzovaným antioxidačním enzymům jsme TRX1 studovali i nepřímou imunofluorescencí. Po adaptaci na IHH jsme pozorovali translokaci TRX1 z cytosolu do jádra. To koreluje s výsledky studií, kde také pozorovali tuto translokaci vyvolanou oxidačním stresem (Schroeder et al., 2007; Wei et al., 2000). TRX1 je v jádru schopen aktivace signalizace prostřednictvím transkripčních faktorů (např. Nrf2, NF- κ B, AP-1, HIF-1), které souvisí se signální drahou oxidačního stresu. TRX1 totiž redukuje Cys zbytky ve struktuře těchto transkripčních faktorů, což zvyšuje jejich DNA vazebnou aktivitu (Hansen et al., 2004; Hirota et al., 1999; Kim et al., 2001; Takagi et al., 2011; Wei et al., 2000). Kromě toho pokusy na transgenních myších, které měly navíc další kopii genu pro TRX1, ukázaly, že tyto myši byly mnohem odolnější k I/R poškození (Turoczi et al., 2003).

Výzkumy na buněčných liniích rovněž ukazují, že TRX1 nepřímo ovlivňuje expresi MnSOD a současně neovlivňuje množství Cu/ZnSOD a CAT (Andoh et al., 2002; Das et al., 1997). Už dříve jsme prokázali zvýšení relativního množství MnSOD v srdečních mitochondriích po adaptaci na IHH (Balková et al., 2011). Tento nárůst by mohl být způsoben zvýšenou expresí TRX1, který může následně ovlivňovat další signální molekuly. Zdá se tedy, že TRX1 by mohl být jednou z důležitých komponent endogenních protektivních signálních drah v myokardu aktivovaných adaptací na IHH. Do jaké míry hraje nárůst relativního zastoupení TRX1 roli v mechanismu kardioprotekce však zbývá objasnit.

Kvůli pozorovanému nárůstu TRX1 po adaptaci na IHH jsme také stanovili relativní množství TRXR1, která udržuje TRX1 v redukované formě. Množství proteinu TRXR1 se po adaptaci na IHH nezměnilo. Oproti tomu Naranjo-Suarez et al. pozorovali na kultuře buněk vystavených hypoxii (1% O₂) pokles TRXR1 jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu (Naranjo-Suarez et al., 2012). Nicméně bylo prokázáno, že inhibice TRXR1 zvyšuje I/R poškození myokardu (Andoh et al., 2002; Park & Suzuki, 2007). Tato inhibice totiž může vést k hromadění TRX1 v oxidovaném stavu, který nemá antioxidační ani antiapoptotické účinky (Andoh et al., 2002). Na druhou stranu Watson et al. naznačují, že ani 90% inhibice TRXR1 nezvyšuje oxidaci TRX1 (Watson et al., 2008). Otázkou zůstává, je-li v modelu IHH nezměněné množství TRXR1 dostatečné pro redukci

zvýšeného množství TRX1. Nebo zda může být TRX1 redukován i jiným enzymem či při oxidačním stresu dochází v kardiomyocytech k hromadění oxidovaného TRX1.

Dalším stanoveným enzymem byl mitochondriální TRX2, jehož množství se po IHH adaptaci nezměnilo. Zhou et al. stanovili relativní množství mRNA TRX2 v myokardu potkana po adaptaci na intermitentní normobarickou hypoxii (5-10% O₂/21% O₂ ve 120 sekundových cyklech; 8 hodin denně). Zjistili, že tento model adaptace zvyšuje oxidační stres a současně i relativní množství mRNA TRX2 (Zhou et al., 2012). Je ale třeba podotknout, že účinky chronické hypoxie na relativní zastoupení proteinů závisí na konkrétním experimentálním modelu. Co se týče mitochondriálních proteinů, tak jsme dříve publikovali, že adaptace na IHH, zvýšila aktivitu a relativní množství MnSOD v mitochondriální frakci z LV potkana. Tento efekt však nebyl pozorován na úrovni homogenátu (Balková et al., 2011; Kolář et al., 2007). Vysvětlením tohoto rozdílu může být pokles mitochondriální hmoty po adaptaci na IHH. Pozorovali jsme totiž snížení množství komplexů mitochondriálního elektrontransportního řetězce (Hlaváčková et al., 2010) a proteinu pyruvátdehydrogenázy (Balková et al., 2011). Navíc jsme také prokázali pokles markeru vnitřní mitochondriální membrány, kardiolipinu, o 12 % (Ježková et al., 2002). Podobně v jiné laboratoři pozorovali pokles komplexů mitochondriálního elektrontransportního řetězce po adaptaci na kontinuální hypobarickou hypoxii (5 000 m, 21 dní) (Nouette-Gaulain et al., 2005). Pokud tedy během IHH dochází k úbytku mitochondriální hmoty, mělo by být relativní množství TRX2 v mitochondriální frakci mírně zvýšené.

Z výsledků tedy vyplývá, že adaptace na IHH má na antioxidační enzymy v myokardu dvojí vliv. Snížení relativního množství některých enzymů (např. PRX a Cu/ZnSOD) by mohlo přispívat ke zvýšení hladiny ROS v kardiomyocytech. ROS ale následně aktivují expresi TRX1 a MnSOD, přičemž aktivace TRX1 se zdá být obzvláště významná, protože je tento enzym schopen ovlivnit celou řadu transkripčních faktorů, a tak dále šířit kardioprotektivní signál.

6.4 Enzymy metabolismu železa v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

6.4.1 Imunodetekce enzymů metabolismu železa

V souvislosti s vlivem metabolismu železa (Fe) na redoxní stav buňky jsme v naší laboratoři zavedli stanovení hemoxygenázy 1 a 2 (HO1 a HO2) a akonitázy 1 a 2 (ACO1 a ACO2).

Detekce enzymů metabolismu Fe byla provedena pomocí běžně dostupných primárních protilátek, které jsou používány i v dalších pracích. K identifikaci enzymů HO1 (Buehler et al., 2012; Guo et al., 2014), HO2 (Nassar et al., 2011), ACO1 a ACO2 (Andres-Mateos et al., 2007; Kim et al., 2014) byly použity primární protilátky od firmy Abcam.

Pozici ECL signálu jednotlivých enzymů metabolismu Fe jsme zjistili srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti se dvěma barevnými proteinovými standardy známých molekulových hmotností. Pro identifikaci HO2 byl navíc jako pozitivní kontrola použit extrakt homogenátu mozku, protože HO2 je nejvíce exprimována v nervové soustavě (Christou et al., 2000; West & Oates, 2008). Výhodou ECL signálu obou HO i ACO je, že se v jejich okolí nevyskytuje žádný nespecifický signál jiného proteinu.

Obdobě jako v dalších publikacích jsme detekovali HO1 jako pruh o molekulové hmotnosti 32 kDa (Barber et al., 1999; Buehler et al., 2012; Calvert et al., 2009; Wang et al., 2006), signál HO2 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 36 kDa (Barber et al., 1999; Wang et al., 2006), ACO1 jako pruh o molekulové hmotnosti 98 kDa (Carrari et al., 2003; Hanson & Leibold, 1998) a signál ACO2 byl identifikován jako pruh o molekulové hmotnosti 85 kDa (Brandina et al., 2006; Saraswathy & Rao, 2009).

6.4.2 Relativní množství enzymů metabolismu železa

Díky úzké souvislosti iontů Fe s redoxním stavem buňky jsme se dále zaměřili na studium vlivu chronické hypoxie na enzymy metabolismu Fe. Volné Fe má totiž prooxidační účinky, protože se účastní Fentonovy reakce, ve které vzniká nejnebezpečnější zástupce ROS – OH^\bullet (Nordberg & Arnér, 2001). Stejně tak i volný hem může působit prooxidačně (Lavrovsky et al., 2000). Zajímalo nás tedy, k jakým změnám na proteinové úrovni dochází po adaptaci na IHH u HO1, HO2, ACO1 a ACO2 v homogenátu z myokardu LV potkana v porovnání s normoxickými kontrolami. Zjistili jsme, že se po adaptaci na IHH zvyšuje relativní množství HO1. Zároveň tento model hypoxie nemá vliv na zastoupení HO2, ACO1 a ACO2.

Námi pozorované zvýšení množství HO1 je v souladu s pracemi, které potvrdily, že exprese HO1 může být indukována mj. oxidačním stresem (Clark et al., 2000a; Keyse & Tyrrell, 1987) a hypoxií (Christou et al., 2000; Lee et al., 1997). Oxidační stres nejspíše zvyšuje expresi HO1 prostřednictvím transkripčního faktoru Nrf2, obdobně jako v případě TRX1 (Calvert et al., 2009). Do tohoto procesu se ale pravděpodobně zapojují i jiné transkripční faktory (např. AP-1, NF- κ B). Antioxidační působení HO1 spočívá v katalýze reakce vedoucí k degradaci prooxidačního hemu a ke vzniku biliverdinu, ze kterého následně vzniká antioxidant bilirubin (Morse & Choi, 2002). Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace bilirubinu v myokardu, ať už díky zvýšené expresi HO1 nebo jeho exogenním dodáním, zmenšuje velikost infarktu myokardu a poškození mitochondrií (Clark et al., 2000b). HO1 také při reakci uvolňuje oxid uhelnatý (CO), který vyvolává vazodilataci cév, a tím zlepšuje prokrvení hypoxického srdce. CO navíc působí antiapoptoticky, protizánětlivě a snižuje ventrikulární fibrilace vyvolané I/R poškozením (Bak et al., 2003). Navíc Clark et al. pozorovali, že podání heminu (substrát HO1) potkanům 24 hodin před ischemií vedlo ke zvýšení exprese HO1 a současně ke zmenšení infarktu myokardu a zlepšení postischemického obnovení srdeční funkce. Naopak inhibice aktivity HO1 pomocí protoporfyrinu IX zabránila protektivnímu působení heminu na srdeční funkci (Clark et al., 2000b). Význam HO1 pro správnou srdeční funkci je také v souladu s pozorováním, že polymorfismus v promotoru genu pro HO1 zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Haines et al., 2012).

Z výzkumů rovněž vyplývá, že existuje úzký vztah mezi TRX1 a HO1. TRX1 totiž nepřímo zvyšuje expresi HO1 (Kaga et al., 2005; Wiesel et al., 2000). Jak již bylo řečeno dříve, TRX1 ovlivňuje DNA vazebnou aktivitu řady transkripčních faktorů a v genu pro HO1 byla nalezena vazebná místa pro některé z nich. V současné době ale není jasné, který transkripční faktor nebo faktory jsou prostředníky v této signální dráze. Možnými kandidáty jsou HIF-1, AP-1, NF- κ B a Nrf2. Je totiž známo, že všechny tyto transkripční faktory mohou být regulovány TRX1 a jedním z jejich cílů je gen pro HO1 (Calvert et al., 2009; Lee et al., 1997; Turoczy et al., 2003; Wiesel et al., 2000).

Pozorované množství HO2 se po adaptaci na IHH nezměnilo. To může být dáno tím, že HO2 je na rozdíl od HO1 konstitutivně exprimovaný enzym (Christou et al., 2000). Nicméně Han et al. ukázali nárůst proteinu HO2 v myším myokardu po adaptaci na kontinuální normobarickou hypoxii (10% O₂; 28 dní) (Han et al., 2010; Han et al., 2005). Je ale nutné podotknout, že HO2 je ve srovnání s HO1 mnohem méně studovaným

enzymem v souvislosti s vlivem hypoxie nebo ischemie na myokard. Sledování množství HO_2 po adaptaci na IHH v srdci je tedy spíše průkopnickým experimentem.

Adaptace na IHH neměla vliv na relativní zastoupení ACO1. Výzkumy zabývající se studiem efektu adaptace na chronickou hypoxii na ACO1 se soustředí spíše na identifikaci převládající aktivity tohoto enzymu. Tedy, zda během hypoxie převládá aktivita ACO1 nebo aktivita proteinu regulujícího železo 1 (IRP1) (Chepelev & Willmore, 2011; Christova & Templeton, 2007; Schneider & Leibold, 2003). Námi používaná primární protilátka proti ACO1 ale neumožnila rozlišení těchto dvou forem, protože ACO1 a IRP1 se liší pouze přítomností železo-sírného klastru $[4\text{Fe-4S}]$ (Schneider & Leibold, 2003). Proto jsme nemohli určit, která aktivita tohoto enzymu během adaptace na IHH převládala.

Zvýšený oxidační stres vznikající při adaptaci na IHH (Kolář et al., 2007) může enzym ACO1 ovlivnit dvěma způsoby. Jednak vznikající $\text{O}_2^{\bullet-}$ způsobují oxidaci $[4\text{Fe-4S}]$ klastru ve struktuře ACO1 a jeho změnu na $[3\text{Fe-4S}]$, čímž ACO1 ztrácí enzymovou aktivitu. Nedochází ale k rozpadu klastru, a proto ACO1 nezískává aktivitu IRP1. Oproti tomu H_2O_2 a reaktivní formy dusíku (RNS – NO a peroxynitrit) vyvolávají ztrátu $[4\text{Fe-4S}]$ klastru a konverzi ACO1 na IRP1. Zdá se tedy, že fyziologická hladina ROS a RNS je zřejmě nezbytná pro senzitivitu IRP1 vůči koncentraci Fe v buňce. Stabilitu $[4\text{Fe-4S}]$ klastru ve struktuře ACO1 také narušuje fosforylace ACO1 prostřednictvím PKC (Anderson et al., 2012). Zdá se tedy, že během chronické hypoxie by kvůli zvýšenému oxidačnímu stresu (Kolář et al., 2007) a množství PKC (Neckář et al., 2005) měla převládat aktivita IRP1 nad ACO1 aktivitou. Výzkumy ale ukázaly, že je-li při hypoxii dostatek Fe, tak v buňce převládá ACO1 forma (Anderson et al., 2012; Christova & Templeton, 2007). Pro odhalení úlohy ACO1/IRP1 v myokardu adaptovaném na IHH, je potřeba provést další experimenty, které by odlišily dvě rozdílné aktivity tohoto enzymu.

Stanovené množství proteinu ACO2 se po adaptaci na IHH nezměnilo. Stejně tak naše dřívější výsledky ukázaly, že vystavení potkanů kontinuální normobarické hypoxii (10% O_2 ; 21 dní) nemělo vliv na množství ACO2 v myokardu (Zajíčková, 2013). Stejně jako TRX2 je ale i ACO2 mitochondriální protein, a proto může být tento výsledek ovlivněn úbytkem mitochondriální hmoty v důsledku adaptace na chronickou hypoxii. Nicméně obdobně jako u ACO1 oxidační stres vyvolává inaktivaci ACO2 prostřednictvím rozpadu $[4\text{Fe-4S}]$ klastru (Cantu et al., 2011). Tyto závěry byly potvrzeny ve studii na kultuře plicních epitelálních buněk, ve kterých hypoxie (1% O_2) a následná reoxygenace

vedla ke zvýšení množství O_2^{\bullet} , což bylo doprovázeno poklesem aktivity ACO2 (Powell & Jackson, 2003).

Ze stanovených enzymů metabolismu Fe se zdá být významná především HO1. Její aktivita by totiž mohla přispět ke kardioprotektivnímu efektu adaptace na IHH. Dále by bylo zajímavé odhalit, zda během této adaptace převládá aktivita ACO1 nebo aktivita IRP1, protože IRP1 je schopen regulace dalších proteinů.

6.5 Relativní množství na kalcium nezávislé fosfolipázy A_2 v myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii – vliv tempolu

S cílem zjistit roli oxidačního stresu jsme v tomto experimentu sledovali vliv antioxidantu tempolu na relativní množství na kalcium nezávislé fosfolipázy A_2 (iPLA₂) v myokardu LV potkana po IHH. Chtěli jsme ověřit výsledky předchozího pokusu, ve kterém jsme pozorovali vliv podávání jiného antioxidantu, N-acetylcysteinu (NAC), na relativní množství iPLA₂ u stejného modelu adaptace (Forštová, 2008).

Imunodetekce iPLA₂ byla v naší laboratoři zavedena již dříve (Forštová, 2008). Pro detekci byla použita primární protilátka od firmy Cayman obdobně jako v předchozí práci a stejně jako v jiných studiích byla iPLA₂ detekována jako pruh o molekulové hmotnosti 85-88 kDa (Forštová, 2008; Gong et al., 2006; Williams & Gottlieb, 2002). V myokardu se vyskytují především dvě izoformy iPLA₂ – iPLA₂ β a iPLA₂ γ . Komerční primární protilátka od firmy Cayman ale není schopná rozlišit tyto dvě izoformy. Důvodem je homologie obou izoform a také jejich velmi podobná molekulová hmotnost (iPLA₂ β – 85 kDa; iPLA₂ γ – 90 kDa) (Dennis et al., 2011). Touto primární protilátkou jsme tedy stanovili relativní množství obou dvou izoform iPLA₂.

V této práci jsme potvrdili pokles relativního zastoupení iPLA₂ po IHH adaptaci. To je v souladu s prací na kultuře buněk endotelu vystavených dlouhodobému působení chronické hypoxie, kde také pozorovali snížení aktivity iPLA₂ (Tretyakov & Farber, 1993). Naopak McHowat et al. po krátké hypoxii (5 minut) v izolovaných králičích kardiomyocytech prokázali nárůst aktivity iPLA₂ provázený zvýšeným uvolňováním kyseliny arachidonové z membránových fosfolipidů (McHowat et al., 1998).

Z dosavadního výzkumu vyplývá, že iPLA₂ mohou v myokardu působit dvěma způsoby. Protektivní role iPLA₂ spočívá v udržování homeostáze buněčných membrán tím, že přednostně hydrolyzují peroxidované mastné kyseliny (FA) z membránových fosfolipidů kardiomyocytů (Kinsey et al., 2005; Kinsey et al., 2007; Seleznev et al., 2006). Konformační změny v acylových řetězcích FA peroxidovaných fosfolipidů totiž zvyšují

hydrolytickou aktivitu iPLA₂ na membránách (Kinsey et al., 2008; McHowat et al., 2001a; McHowat et al., 2001b; Swift et al., 2003). Vzniklé 2-lyzofosfolipidy mohou být následně recyklovány jinou FA v deacylačně/reacylačním cyklu (Pérez et al., 2006). Protektivní funkce iPLA₂ byla prokázána ve studiích s anthracykliny, které jsou účinnými medikamenty při protinádorové terapii. Vedlejším účinkem anthracyklinů je ale produkce O₂[•], který způsobuje peroxidaci membránových fosfolipidů. Studie na srdečních buňkách ukázaly, že inaktivace iPLA₂ prostřednictvím anthracyklinů vede k omezení reparačních mechanismů, které opravují oxidačně modifikované fosfolipidy (McHowat et al., 2001a; Swift et al., 2003). Navíc inhibice iPLA₂ vede ke zvýšené lipidové peroxidaci indukované oxidačním stresem (Cummings et al., 2002; Kinsey et al., 2008) a také má za následek akumulaci oxidovaných fosfolipidů ve vnitřní mitochondriální membráně, což narušuje funkci elektrontransportního řetězce a vede k rozvoji apoptózy (Kinsey et al., 2008). Na druhou stranu aktivita iPLA₂ může mít i škodlivé účinky. V průběhu deacylačně/reacylačního cyklu je totiž pro reacylační proces nezbytné ATP. Nemá-li buňka dostatek ATP, nebo je-li míra oxidačního stresu pro organismus příliš zatěžující, hydrolytická aktivita iPLA₂ buňku spíše poškozuje. Tento stav nastává např. za I/R podmínek, kdy iPLA₂ membránové fosfolipidy pouze deacyluje (Mancuso et al., 2003; Rahnema et al., 2011; Williams & Gottlieb, 2002). To vede ke změně fluidity membrány, narušení homeostáze Ca²⁺ iontů a dále uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Williams & Gottlieb, 2002).

Jak již bylo řečeno dříve, pozorovali jsme snížení relativního zastoupení iPLA₂ po adaptaci na IHH. Naše dosavadní studie demonstrovaly, že se v procesu adaptace na IHH uplatňují mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP (mK_{ATP}) (Neckář et al., 2002), PKC (Hlaváčková et al., 2010; Neckář et al., 2005) a ROS (Kolář et al., 2007). Z literatury vyplývá, že kyselina arachidonová uvolněná z membránových fosfolipidů mitochondrií působením iPLA₂ přispívá k inhibici mK_{ATP} (Kim & Duff, 1990; Williams & Gottlieb, 2002), jejichž otevření je zahrnuto v kardioprotektivním působení chronické hypoxie (Neckář et al., 2002). Dosavadní studie také ukazují, že PKC fosforyluje iPLA₂, a tím je aktivuje. Jednotlivé studie se ale rozcházejí v tom, o jakou izoformu PKC se jedná. Některé práce navrhuje PKCε (Kinsey et al., 2007; Steer et al., 2002), jiné PKCα (Osada-Oka et al., 2006). Podle výsledku naší laboratoře je ale v signalizaci aktivované adaptací na IHH zapojena PKCδ (Hlaváčková et al., 2010; Neckář et al., 2005), takže není jasné, jestli k fosforylaci iPLA₂ dochází i v modelu IHH.

Pozorovaný pokles iPLA₂ po adaptaci na IHH může být způsoben nárůstem oxidačního stresu. Ten inhibuje aktivitu iPLA₂ oxidací jejich Cys zbytků (Song et al., 2006), které jsou ve struktuře iPLA₂ hojně zastoupeny (Dennis et al., 2011). To je v souladu se studiemi, ve kterých aplikace inhibitoru iPLA₂, bromenollaktonu (BEL), působí kardioprotektivně (Mancuso et al., 2003; Sargent et al., 1996; Williams & Gottlieb, 2002). BEL totiž také inhibuje iPLA₂ prostřednictvím modifikací jejich Cys (Song et al., 2006). Naopak Martínez a Moreno na kultuře makrofágů ukázali zvýšenou aktivitu iPLA₂ způsobenou ROS (O₂[•] a H₂O₂) (Martínez & Moreno, 2001).

V naší dřívější práci jsme sledovali vliv antioxidantu NAC na relativní množství iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxického a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu LV potkana. Zjistili jsme, že podávání NAC hypoxické skupině zvířat vrátilo relativní množství iPLA₂ na hodnoty normoxických kontrol (Foršťová, 2008). Tento výsledek je v souladu s našimi předchozími výsledky, kde podání NAC potkanům adaptovaným na IHH zrušilo protektivní efekt adaptace (Kolář et al., 2007). V experimentu s antioxidantem tempolem, uvedeným v této práci, jsme docílili stejného trendu. Nicméně tento experiment vrátil relativní množství iPLA₂ u hypoxické skupiny na hodnotu normoxických kontrol jen zčásti. Mírné rozdíly ve vlivu těchto dvou antioxidantů na relativní zastoupení iPLA₂ mohou být způsobeny jednak jejich odlišným chemickým složením, ale i jiným způsobem aplikace experimentálním zvířatům a odlišným zpracováním srdeční tkáně. Tempol byl potkanům podáván rozpuštěn v pitné vodě, zatímco NAC byl potkanům aplikován subkutánně před každou hypoxickou expozicí, což mohlo navýšit stres, kterému byla laboratorní zvířata vystavena (Foršťová, 2008).

Z hlediska kardioprotektivního účinku chronické hypoxie lze předpokládat, že během adaptace na IHH způsobuje zvýšená hladina ROS inaktivaci a následnou degradaci iPLA₂. Tím zároveň dochází k protekci membránových fosfolipidů před hydrolýzou a k ochraně buňky před produkcí zánětlivých eikosanoidů, které vznikají z kyseliny arachidonové. Současně může fungovat kardioprotektivní efekt mK_{ATP}, které by byly v důsledku aktivity iPLA₂ inhibovány. Objasnění případné role iPLA₂ v mechanismu endogenní kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii vyžaduje další výzkum (např. použitím specifických inhibitorů). Lze ale předpokládat, že použití inhibitorů iPLA₂ by mohlo mít značný klinický význam.

7 Shrnutí

Výsledky diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Hledání vhodného housekeeping proteinu pro model IHH:
 - Adaptace na chronickou hypoxii zvýšila relativní množství HPRT1 o 25 %.HPRT1 tedy není vhodným housekeeping proteinem pro model IHH.
- 2) Vliv chronické hypoxie na relativní množství antioxidantních enzymů:
 - Adaptace na IHH snížila relativní množství PRX6 o 41 %.
 - Současně zvýšila množství TRX1 o 70 %.
 - Relativní zastoupení TRX2 a TRXR1 se po adaptaci na IHH nezměnilo.
- 3) Imunofluorescenční analýza naznačila translokaci TRX1 z cytosolu do jádra v kardiomyocytech po adaptaci na IHH.
- 4) Vliv chronické hypoxie na relativní zastoupení enzymů metabolismu železa:
 - Adaptace na IHH zvýšila relativní zastoupení HO1 o 462 %.
 - Relativní množství HO2, ACO1 a ACO2 se po adaptaci na IHH nezměnilo.
- 5) Vliv antioxidantu tempolu na relativní zastoupení iPLA₂:
 - Potvrdili jsme signifikantní pokles relativního množství iPLA₂ po adaptaci na IHH (o 14 %).
 - Chronické podávání tempolu během adaptace na IHH odstranilo protektivní efekt chronické hypoxie na relativní množství iPLA₂.

8 Závěr

Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH) zvyšuje oxidační stres, který je spojený s indukcí kardioprotektivních endogenních signálních drah. Výsledky této práce naznačují, že TRX1 a HO1 mohou být jedny z důležitých signálních molekul zapojených v kardioprotekci. Potvrdili jsme také, že se zvýšená produkce ROS prokazatelně podílí na změnách množství iPLA₂ po adaptaci na IHH. Objasnění molekulárního mechanismu adaptace na IHH by bylo velmi přínosné pro farmakoterapii kardiovaskulárních onemocnění. Odhalení enzymů zapojených do těchto protektivních signálních drah ale vyžaduje další výzkum, který by se měl zaměřit např. na sledování vlivu jejich inhibitorů/aktivátorů nebo rozlišení izoform a aktivit daných enzymů.

9 Seznam použité literatury

- Ahsan MK, Lekli I, Ray D, Yodoi J, Das DK (2009) Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2741-2758
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Manipulating proteins, DNA and RNA. In *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*, pp 469-546. Garland Science, New York
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1468-1483
- Andoh T, Chock PB, Chiueh CC (2002) The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem* **277**: 9655-9660
- Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B, Greco TM, Thomas B, Ko HS, Sasaki M, Ischiropoulos H, Przedborski S, Dawson TM, Dawson VL (2007) DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14807-14812
- Arnér ES, Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109
- Asemu G, Neckář J, Szárszoi O, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F (2000) Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* **49**: 597-606
- Bak I, Szendrei L, Turoczi T, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacsakay I, Balla J, Kovacs P, Tosaki A (2003) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* **17**: 2133-2135
- Balková P, Hlaváčková M, Milerová M, Neckář J, Kolář F, Novák F, Nováková O (2011) N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* **60**: 467-474
- Barber A, Robson SC, Lyall F (1999) Hemoxygenase and nitric oxide synthase do not maintain human uterine quiescence during pregnancy. *Am J Pathol* **155**: 831-840
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandina I, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krasheninnikov I, Sweetlove L, Tarassov I, Martin RP (2006) Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1217-1228
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3289-3303

- Brixius K, Schwinger RH, Hoyer F, Napp A, Renner R, Bölck B, Kümin A, Fischer U, Mehlhorn U, Werner S, Bloch W (2007) Isoform-specific downregulation of peroxiredoxin in human failing myocardium. *Life Sci* **81**: 823-831
- Buehler PW, Baek JH, Lisk C, Connor I, Sullivan T, Kominsky D, Majka S, Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Bonaventura J, Irwin DC (2012) Free hemoglobin induction of pulmonary vascular disease: evidence for an inflammatory mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**: L312-326
- Cadenas C, Franckenstein D, Schmidt M, Gehrman M, Hermes M, Geppert B, Schormann W, Maccoux LJ, Schug M, Schumann A, Wilhelm C, Freis E, Ickstadt K, Rahnenführer J, Baumbach JI, Sickmann A, Hengstler JG (2010) Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**: R44
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **108**: 79-85
- Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res* **105**: 365-374
- Cantu D, Fulton RE, Drechsel DA, Patel M (2011) Mitochondrial aconitase knockdown attenuates paraquat-induced dopaminergic cell death via decreased cellular metabolism and release of iron and H₂O₂. *J Neurochem* **118**: 79-92
- Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Loureiro ME, Fernie AR (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol* **133**: 1322-1335
- Carreira R, Duarte A, Monteiro P, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR, Gonçalves LM, Providência LA (2004) Carvedilol protects ischemic cardiac mitochondria by preventing oxidative stress. *Rev Port Cardiol* **23**: 1447-1455
- Cedars A, Jenkins CM, Mancuso DJ, Gross RW (2009) Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* **53**: 277-289
- Chakraborti S (2003) Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* **15**: 637-665
- Chen XJ, Wang X, Butow RA (2007) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13738-13743
- Chepelev NL, Willmore WG (2011) Regulation of iron pathways in response to hypoxia. *Free Radic Biol Med* **50**: 645-666

- Chiao YA, Zamilpa R, Lopez EF, Dai Q, Escobar GP, Hakala K, Weintraub ST, Lindsey ML (2010) In vivo matrix metalloproteinase-7 substrates identified in the left ventricle post-myocardial infarction using proteomics. *J Proteome Res* **9**: 2649-2657
- Christou H, Morita T, Hsieh CM, Koike H, Arkonac B, Perrella MA, Kourembanas S (2000) Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. *Circ Res* **86**: 1224-1229
- Christova T, Templeton DM (2007) Effect of hypoxia on the binding and subcellular distribution of iron regulatory proteins. *Mol Cell Biochem* **301**: 21-32
- Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R (2000a) Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* **348 Pt 3**: 615-619
- Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R (2000b) Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H643-651
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2002) Role of an endoplasmic reticulum Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F492-498
- Dammeyer P, Arnér ES (2011) Human Protein Atlas of redox systems - what can be learnt? *Biochim Biophys Acta* **1810**: 111-138
- Das KC, Lewis-Molock Y, White CW (1997) Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 713-726
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* **111**: 6130-6185
- Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN (2003) Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res* **13**: 385-391
- Eismann T, Huber N, Shin T, Kuboki S, Galloway E, Wyder M, Edwards MJ, Greis KD, Shertzer HG, Fisher AB, Lentsch AB (2009) Peroxiredoxin-6 protects against mitochondrial dysfunction and liver injury during ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**: G266-274
- Fatma N, Singh P, Chhunchha B, Kubo E, Shinohara T, Bhargavan B, Singh DP (2011) Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**: C954-967
- Fisher AB (2011) Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid Redox Signal* **15**: 831-844

- Forštová P (2008) Diplomová práce: Exprese na kalcium nezávislé fosfolipasy A₂ v myokardu adaptovaném na chronickou hypoxii. *Univerzita Karlova v Praze*
- Go YM, Jones DP (2010) Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. *Antioxid Redox Signal* **13**: 489-509
- Gong MC, Arbogast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid MB (2006) Calcium-independent phospholipase A₂ modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol* (1985) **100**: 399-405
- Guo C, Zhu Y, Weng Y, Wang S, Guan Y, Wei G, Yin Y, Xi M, Wen A (2014) Therapeutic time window and underlying therapeutic mechanism of breviscapine injection against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *J Ethnopharmacol* **151**: 660-666
- Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A (2012) Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta Physiol (Oxf)* **204**: 487-501
- Han F, Takeda K, Ono M, Date F, Ishikawa K, Yokoyama S, Shinozawa Y, Furuyama K, Shibahara S (2010) Hypoxemia induces expression of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 proteins in the mouse myocardium. *J Biochem* **147**: 143-151
- Han F, Takeda K, Yokoyama S, Ueda H, Shinozawa Y, Furuyama K, Shibahara S (2005) Dynamic changes in expression of heme oxygenases in mouse heart and liver during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 653-659
- Hansen JM, Watson WH, Jones DP (2004) Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol Sci* **82**: 308-317
- Hanson ES, Leibold EA (1998) Regulation of iron regulatory protein 1 during hypoxia and hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* **273**: 7588-7593
- Harden CJ, Perez-Carrion K, Babakordi Z, Plummer SF, Hepburn N, Barker ME, Wright PC, Evans CA, Corfe BM (2012) Evaluation of the salivary proteome as a surrogate tissue for systems biology approaches to understanding appetite. *J Proteomics* **75**: 2916-2923
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 27891-27897
- Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F, Nováková O (2010) Up-regulation and redistribution of protein kinase C-δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* **345**: 271-282
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**: 435-459

- Hosick PA, Stec DE (2012) Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**: R207-214
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12475-12480
- Im JY, Lee KW, Woo JM, Junn E, Mouradian MM (2012) DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. *Hum Mol Genet* **21**: 3013-3024
- Ishii T, Warabi E, Yanagawa T (2012) Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* **50**: 91-105
- Iwaki K, Chi SH, Dillmann WH, Mestrl R (1993) Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress. *Circulation* **87**: 2023-2032
- Jenkins CM, Cedars A, Gross RW (2009) Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovasc Res* **82**: 240-249
- Ježková J, Nováková O, Kolář F, Tvrzická E, Neckář J, Novák F (2002) Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* **232**: 49-56
- Kaga S, Zhan L, Matsumoto M, Maulik N (2005) Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *J Mol Cell Cardiol* **39**: 813-822
- Keyse SM, Tyrrell RM (1987) Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem* **262**: 14821-14825
- Kim C, Kim JY, Kim JH (2008) Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep* **41**: 555-559
- Kim D, Duff RA (1990) Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circ Res* **67**: 1040-1046
- Kim HS, Manevich Y, Feinstein SI, Pak JH, Ho YS, Fisher AB (2003) Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L363-369
- Kim SJ, Cheres P, Williams D, Cheng Y, Ridge K, Schumacker PT, Weitzman S, Bohr VA, Kamp DW (2014) Mitochondria-targeted Ogg1 and aconitase-2 prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **289**: 6165-6176
- Kim YC, Masutani H, Yamaguchi Y, Itoh K, Yamamoto M, Yodoi J (2001) Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the

- antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J Biol Chem* **276**: 18399-18406
- Kinsey GR, Blum JL, Covington MD, Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2008) Decreased iPLA2gamma expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J Lipid Res* **49**: 1477-1487
- Kinsey GR, Cummings BS, Beckett CS, Saavedra G, Zhang W, McHowat J, Schnellmann RG (2005) Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 287-293
- Kinsey GR, McHowat J, Beckett CS, Schnellmann RG (2007) Identification of calcium-independent phospholipase A2gamma in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F853-860
- Kolář F, Ježková J, Balková P, Breh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J, Herget J (2007) Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H224-230
- Kolář F, Ošťádal B (2004) Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S3-13
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Rajecová O, Strec V, Barta E (1988) Age-dependent influence of a moderate altitude (1,350 m) on the rat cardiopulmonary system. *Physiol Bohemoslov* **37**: 443-450
- Kopecký M, Daum S (1958) Adaptation of the myocardium to altitude anoxia. *Cesk Fysiol* **7**: 218-219
- Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK (2000) Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFkappaB. *Mech Ageing Dev* **114**: 49-60
- Lee CK, Kim HJ, Lee YR, So HH, Park HJ, Won KJ, Park T, Lee KY, Lee HM, Kim B (2007) Analysis of peroxiredoxin decreasing oxidative stress in hypertensive aortic smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 848-855
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* **272**: 5375-5381
- Lillig CH, Berndt C, Holmgren A (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1304-1317
- Lomnytska MI, Becker S, Gemoll T, Lundgren C, Habermann J, Olsson A, Bodin I, Engström U, Hellman U, Hellman K, Hellström AC, Andersson S, Mints M, Auer G (2012) Impact of genomic stability on protein expression in endometrioid endometrial cancer. *Br J Cancer* **106**: 1297-1305

- Lu J, Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **66**: 75-87
- Magalhães J, Ascensão A, Soares JM, Neuparth MJ, Ferreira R, Oliveira J, Amado F, Duarte JA (2004) Acute and severe hypobaric hypoxia-induced muscle oxidative stress in mice: the role of glutathione against oxidative damage. *Eur J Appl Physiol* **91**: 185-191
- Magalhães J, Gonçalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Rizo D, Viscor G, Oliveira PJ, Torrella JR, Ascensão A (2014) Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia. *Int J Cardiol* **173**: 40-45
- Mancuso DJ, Abendschein DR, Jenkins CM, Han X, Saffitz JE, Schuessler RB, Gross RW (2003) Cardiac ischemia activates calcium-independent phospholipase A2beta, precipitating ventricular tachyarrhythmias in transgenic mice: rescue of the lethal electrophysiologic phenotype by mechanism-based inhibition. *J Biol Chem* **278**: 22231-22236
- Mancuso DJ, Sims HF, Han X, Jenkins CM, Guan SP, Yang K, Moon SH, Pietka T, Abumrad NA, Schlesinger PH, Gross RW (2007) Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype. *J Biol Chem* **282**: 34611-34622
- Manevich Y, Fisher AB (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* **38**: 1422-1432
- Martínez J, Moreno JJ (2001) Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* **392**: 257-262
- Masutani H, Ueda S, Yodoi J (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**: 991-998
- Maulik N, Das DK (2008) Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1368-1382
- McCommis KS, McGee AM, Laughlin MH, Bowles DK, Baines CP (2011) Hypercholesterolemia increases mitochondrial oxidative stress and enhances the MPT response in the porcine myocardium: beneficial effects of chronic exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**: R1250-1258
- McGrath JJ, Procházka J, Pelouch V, Ošťádal B (1973) Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J Appl Physiol* **34**: 289-293
- McHowat J, Creer MH (2004) Catalytic features, regulation and function of myocardial phospholipase A2. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* **2**: 209-218

- McHowat J, Liu S, Creer MH (1998) Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca^{2+} -independent PLA2 in hypoxic ventricular myocytes. *Am J Physiol* **274**: C1727-1737
- McHowat J, Swift LM, Arutunyan A, Sarvazyan N (2001a) Clinical concentrations of doxorubicin inhibit activity of myocardial membrane-associated, calcium-independent phospholipase A(2). *Cancer Res* **61**: 4024-4029
- McHowat J, Swift LM, Sarvazyan N (2001b) Oxidant-induced inhibition of myocardial calcium-independent phospholipase A2. *Cardiovasc Toxicol* **1**: 309-316
- Meerson FZ, Gomzakov OA, Shimkovich MV (1973) Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* **31**: 30-34
- Meerson FZ, Ustinova EE, Manukhina EB (1989) Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. *Biomed Biochim Acta* **48**: S83-88
- Meerson FZ, Ustinova EE, Orlova EH (1987) Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin Cardiol* **10**: 783-789
- Minich T, Yokota S, Dringen R (2003) Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *J Neurochem* **86**: 605-614
- Monge C, León-Velarde F (1991) Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev* **71**: 1135-1172
- Moon SH, Jenkins CM, Liu X, Guan S, Mancuso DJ, Gross RW (2012) Activation of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) by divalent cations mediating arachidonate release and production of downstream eicosanoids. *J Biol Chem* **287**: 14880-14895
- Moret PR (1980) Hypoxia and the heart. In *Hearts and Heart-like Organs* (Bourne, G.H. ed.), pp 333-387 Academic Press, New York
- Morse D, Choi AM (2002) Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**: 8-16
- Morse D, Choi AM (2005) Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med* **172**: 660-670
- Myers JM, Antholine WE, Myers CR (2011) The intracellular redox stress caused by hexavalent chromium is selective for proteins that have key roles in cell survival and thiol redox control. *Toxicology* **281**: 37-47

- Nagy N, Malik G, Fisher AB, Das DK (2006) Targeted disruption of peroxiredoxin 6 gene renders the heart vulnerable to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H2636-2640
- Naranjo-Suarez S, Carlson BA, Tsuji PA, Yoo MH, Gladyshev VN, Hatfield DL (2012) HIF-independent regulation of thioredoxin reductase 1 contributes to the high levels of reactive oxygen species induced by hypoxia. *PLoS One* **7**: e30470
- Nassar NN, Li G, Strat AL, Abdel-Rahman AA (2011) Enhanced hemoxygenase activity in the rostral ventrolateral medulla mediates exaggerated hemin-evoked hypotension in the spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* **339**: 267-274
- Neckář J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B, Kolář F (2005) Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H1566-1572
- Neckář J, Ošťádal B, Kolář F (2004) Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* **53**: 621-628
- Neckář J, Szárszoi O, Koten L, Papoušek F, Ošťádal B, Grover GJ, Kolář F (2002) Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* **55**: 567-575
- Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**: 1287-1312
- Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Sztark F (2005) Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* **66**: 132-140
- O'Bryan MK, Clark BJ, McLaughlin EA, D'Sylva RJ, O'Donnell L, Wilce JA, Sutherland J, O'Connor AE, Whittle B, Goodnow CC, Ormandy CJ, Jamsai D (2013) RBM5 is a male germ cell splicing factor and is required for spermatid differentiation and male fertility. *PLoS Genet* **9**: e1003628
- Osada-Oka M, Takahashi M, Akiba S, Sato T (2006) Involvement of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in the translocation of hypoxia-inducible factor-1alpha to the nucleus under hypoxic conditions. *Eur J Pharmacol* **549**: 58-62
- Ošťádal B, Kolář F (2007) Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* **158**: 224-236
- Ošťádal B, Widimský J. (1985) Intermittent hypoxia and cardiopulmonary system. Academia, Prague.
- Park AM, Suzuki YJ (2007) Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol (1985)* **102**: 1806-1814

- Patton SM, Piñero DJ, Surguladze N, Beard J, Connor JR (2005) Subcellular localization of iron regulatory proteins to Golgi and ER membranes. *J Cell Sci* **118**: 4365-4373
- Pei JM, Zhou JJ, Bian JS, Yu XC, Fung ML, Wong TM (2000) Impaired $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i responses to kappa-opioid receptor stimulation in the heart of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: C1483-1494
- Plant PJ, Correa J, Goldenberg N, Bain J, Batt J (2009) The inositol phosphatase MTMR4 is a novel target of the ubiquitin ligase Nedd4. *Biochem J* **419**: 57-63
- Powell CS, Jackson RM (2003) Mitochondrial complex I, aconitase, and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation: modulation of enzyme activities by MnSOD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L189-198
- Prabhakar NR (2012) Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) in hypoxic sensing by the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **184**: 165-169
- Pérez R, Matabosch X, Llebaria A, Balboa MA, Balsinde J (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res* **47**: 484-491
- Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL (2008) Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res* **151**: 68-78
- Rahnema P, Shimoni Y, Nygren A (2011) Reduced conduction reserve in the diabetic rat heart: role of iPLA2 activation in the response to ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**: H326-334
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**: 1543-1552
- Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* **287**: 4403-4410
- Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, Laplace M, Depond S, Adnot S, Crozatier B (1999) Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1697-1708
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **17**: 2596-2606
- Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM (2011) Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* **50**: 777-793
- Saraswathy S, Rao NA (2009) Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 5559-5566

- Sargent CA, Wilde MW, Dzwonczyk S, Tuttle JG, Murray HN, Atwal K, Grover GJ (1996) Glyburide-reversible cardioprotective effects of calcium-independent phospholipase A2 inhibition in ischemic rat hearts. *Cardiovasc Res* **31**: 270-277
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676-682
- Schneider BD, Leibold EA (2003) Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood* **102**: 3404-3411
- Schroeder P, Popp R, Wiegand B, Altschmied J, Haendeler J (2007) Nuclear redox-signaling is essential for apoptosis inhibition in endothelial cells--important role for nuclear thioredoxin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2325-2331
- Seleznev K, Zhao C, Zhang XH, Song K, Ma ZA (2006) Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *J Biol Chem* **281**: 22275-22288
- Simonsen U, Christensen FH, Buus NH (2009) The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacol Ther* **122**: 109-124
- Song H, Bao S, Ramanadham S, Turk J (2006) Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A2. *Biochemistry* **45**: 6392-6406
- Steer SA, Wirsig KC, Creer MH, Ford DA, McHowat J (2002) Regulation of membrane-associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C1621-1626
- Swift L, McHowat J, Sarvazyan N (2003) Inhibition of membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 as a potential culprit of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Res* **63**: 5992-5998
- Tajima M, Katayose D, Bessho M, Isoyama S (1994) Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res* **28**: 312-319
- Takagi Y, Kikuta K, Moriwaki T, Aoki T, Nozaki K, Hashimoto N, Miyamoto S (2011) Expression of thioredoxin-1 and hypoxia inducible factor-1 α in cerebral arteriovenous malformations: Possible role of redox regulatory factor in neoangiogenic property. *Surg Neurol Int* **2**: 61
- Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* **31**: 1335-1341

- Tomanek RJ, Lund DD, Yue X (2003) Hypoxic induction of myocardial vascularization during development. *Adv Exp Med Biol* **543**: 139-149
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**: 145-155
- Tretyakov AV, Farber HW (1993) Endothelial cell phospholipid distribution and phospholipase activity during acute and chronic hypoxia. *Am J Physiol* **265**: C770-780
- Turek Z, Kubát K, Ringnalda BE, Kreuzer F (1980) Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol* **75**: 544-554
- Turoczi T, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK (2003) Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol* **35**: 695-704
- Unno M, Matsui T, Ikeda-Saito M (2012) Crystallographic studies of heme oxygenase complexed with an unstable reaction intermediate, verdoheme. *J Inorg Biochem* **113**: 102-109
- Wang R, Shamloul R, Wang X, Meng Q, Wu L (2006) Sustained normalization of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats by implanted hemin pump. *Hypertension* **48**: 685-692
- Wang ZH, Cai XL, Wu L, Yu Z, Liu JL, Zhou ZN, Liu J, Yang HT (2012) Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia. *Exp Physiol* **97**: 1105-1118
- Wang ZH, Chen YX, Zhang CM, Wu L, Yu Z, Cai XL, Guan Y, Zhou ZN, Yang HT (2011) Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**: H1695-1705
- Waskova-Arnoštová P, Elšnicová B, Kašparová D, Šebesta O, Novotný J, Neckář J, Kolář F, Žurmanová J (2013) Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt. *Cell Physiol Biochem* **31**: 66-79
- Watson WH, Heilman JM, Hughes LL, Spielberger JC (2008) Thioredoxin reductase-1 knock down does not result in thioredoxin-1 oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* **368**: 832-836
- Wei SJ, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, Spitz DR, Goswami PC, Yodoi J, Gius D (2000) Thioredoxin nuclear translocation and interaction with

- redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res* **60**: 6688-6695
- West AR, Oates PS (2008) Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol* **14**: 4101-4110
- White MC, McHowat J (2007) The therapeutic potential of phospholipase A2 inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **5**: 91-95
- Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ošťádal B, Pelouch V, Procházka J (1973) Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* **7**: 798-808
- Wiesel P, Foster LC, Pellacani A, Layne MD, Hsieh CM, Huggins GS, Strauss P, Yet SF, Perrella MA (2000) Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *J Biol Chem* **275**: 24840-24846
- Wilcox CS (2010) Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther* **126**: 119-145
- Wilcox CS, Pearlman A (2008) Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* **60**: 418-469
- Williams SD, Gottlieb RA (2002) Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J* **362**: 23-32
- Xu WQ, Yu Z, Xie Y, Huang GQ, Shu XH, Zhu Y, Zhou ZN, Yang HT (2011) Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* **106**: 329-342
- Ye H, Rouault TA (2010) Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* **49**: 4945-4956
- Yellon DM, Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**: 1113-1151
- Yin X, Zheng Y, Liu Q, Cai J, Cai L (2012) Cardiac response to chronic intermittent hypoxia with a transition from adaptation to maladaptation: the role of hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev* **2012**: 569520
- Yoo MH, Carlson BA, Tsuji P, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL (2010) Alteration of thioredoxin reductase 1 levels in elucidating cancer etiology. *Methods Enzymol* **474**: 255-275
- Yu Y, Xing K, Badamas R, Kuszynski CA, Wu H, Lou MF (2013) Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **57**: 92-104

- Zajíčková P (2013) Diplomová práce: Vliv chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce u spontánně hypertenzních potkanů. *Univerzita Karlova v Praze*
- Zhang R, Al-Lamki R, Bai L, Streb JW, Miano JM, Bradley J, Min W (2004) Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res* **94**: 1483-1491
- Zhou W, Li S, Wan N, Zhang Z, Guo R, Chen B (2012) Effects of various degrees of oxidative stress induced by intermittent hypoxia in rat myocardial tissues. *Respirology* **17**: 821-829
- Zhou Z, Kang YJ (2000) Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J Histochem Cytochem* **48**: 585-594
- Zhu H, Santo A, Li Y (2012) The antioxidant enzyme peroxiredoxin and its protective role in neurological disorders. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**: 143-149